



Susu kental manis



© BSN 2011

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang menyalin atau menggandakan sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun dan dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Acuan normatif.....	1
3 Istilah dan definisi	1
4 Komposisi	1
5 Syarat mutu	2
6 Pengambilan contoh	3
7 Cara uji	3
8 Syarat lulus uji	4
9 Higiene.....	4
10 Pengemasan.....	4
11 Syarat penandaan	4
Lampiran A Cara uji susu kental manis	5
Bibliografi	40

Prakata

Standar Nasional Indonesia (SNI) *Susu kental manis* ini merupakan revisi dari SNI 01-2971-1998, *Susu kental manis*.

Tujuan penyusunan standar ini adalah :

- Melindungi kesehatan konsumen;
- Menjamin perdagangan pangan yang jujur dan bertanggung jawab;
- Diversifikasi produk atau pengembangan produk;
- Mendukung perkembangan industri susu kental manis;
- Merevisi pada bagian definisi dan persyaratan mutu.

Dalam merumuskan SNI ini tim telah memperhatikan hal-hal yang tertera dalam:

1. Undang-undang Republik Indonesia No. 5 Tahun 1984 tentang Perindustrian.
2. Undang-undang Republik Indonesia No. 7 Tahun 1996 tentang Pangan.
3. Undang-undang Republik Indonesia No. 8 Tahun 1999 tentang Perlindungan Konsumen.
4. Undang-undang Republik Indonesia No. 36 Tahun 2009 tentang Kesehatan.
5. Peraturan Pemerintah No. 69 Tahun 1999 tentang Label dan Iklan Pangan.
6. Peraturan Pemerintah No. 28 Tahun 2004 tentang Keamanan, Mutu dan Gizi Pangan.
7. Peraturan Menteri Kesehatan No. 722 Tahun 1988 tentang Bahan tambahan makanan dan revisinya.
8. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia Nomor 75/M-IND/PER/7/2010 tentang Cara Produksi Pangan Olahan Yang baik (Good Manufacturing Practices)
9. Peraturan Menteri Perindustrian Republik Indonesia Nomor tentang Kemasan plastik
10. Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.05.52.4040 Tahun 2006 tentang Kategori pangan
11. Keputusan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia No. HK.00.06.1.52.4011 Tahun 2009 tentang Penetapan Batas Maksimum Cemaran Mikroba dan Kimia dalam Makanan

Standar ini dirumuskan oleh Panitia Teknis 67-04 Makanan dan Minuman, yang telah dibahas melalui rapat teknis, dan disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 30 November 2007 di Jakarta. Hadir dalam rapat tersebut wakil-wakil dari konsumen, produsen, Lembaga IPTEK, Laboratorium Uji, Asosiasi produsen, perguruan tinggi, pakar serta instansi terkait lainnya.

Standar ini telah melalui proses pemungutan suara pada tanggal 27 April 2011 sampai dengan tanggal 26 Juni 2011 dengan hasil akhir RASNI.

Susu kental manis

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan istilah dan definisi, syarat mutu, pengambilan contoh, dan cara uji susu kental manis.

2 Acuan normatif

SNI 0428, *Petunjuk pengambilan contoh padatan*.

3 Istilah dan definisi

2.1

susu kental manis

produk susu berbentuk cairan kental yang diperoleh dari campuran susu dan gula dengan menghilangkan sebagian airnya hingga mencapai tingkat kepekatan tertentu atau hasil rekonstitusi susu bubuk dengan penambahan gula dengan/atau tanpa penambahan bahan pangan lain dan bahan tambahan pangan yang diizinkan

2.2

susu skim kental manis

susu kental manis yang bahan baku susunya berupa susu skim

2.3

susu skim sebagian kental manis

susu kental manis yang bahan baku susunya sebagian berupa susu skim

2.4

Susu kental manis tinggi lemak

susu kental manis yang bahan baku susunya berupa susu yang ditambah dengan lemak susu

Klasifikasi

- a. Susu kental manis
- b. Susu skim kental manis
- c. Susu skim sebagian kental manis
- d. Susu kental manis tinggi lemak

4 Komposisi

4.1 Bahan baku utama

Susu segar dan/atau susu bubuk, air, gula.

4.2 Bahan pangan lain

Bahan pangan lain yang diizinkan.

4.3 Bahan tambahan pangan

Bahan tambahan pangan yang diizinkan untuk produk susu sesuai dengan ketentuan tentang bahan tambahan pangan.

5 Syarat mutu

Syarat mutu susu kental manis sesuai Tabel 1.

Tabel 1 - Syarat mutu susu kental manis

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan			
			Susu kental manis	Susu skim kental manis	Susu skim sebagian kental manis	Susu kental manis tinggi lemak
1	Keadaan					
1.1	Bau	-	normal (sesuai label)	normal (sesuai label)	normal (sesuai label)	normal (sesuai label)
1.2	Rasa	-	normal (sesuai label)	normal (sesuai label)	normal (sesuai label)	normal (sesuai label)
2	Kadar air	% b/b	20-30	20-30	20-30	20-30
3	Lemak	% b/b	min.8	maks.1	1-8	min.16
4	Protein (Nx6,38)	% b/b	min. 6,5*/ min. 6,0**	min.7,8	min. 6,8	min.4,8
5	Total gula dihitung sebagai sakarosa	% b/b	43-48	43-48	43-48	43-48
6	Padatan susu	% b/b	min. 28	min.24	min.24	min. 30
7	Cemaran logam					
7.1	Timbal (Pb)****	mg/kg	maks.0,02	maks. 0,02	maks. 0,02	maks. 0,02
7.2	Timah (Sn)	mg/kg	maks.40,0/ 250,0***	maks.40,0/ 250,0***	maks.40,0/ 250,0***	maks.40,0/ 250,0***
7.3	Merkuri (Hg)****	mg/kg	maks.0,03	maks.0,03	maks.0,03	maks.0,03
8	Arsen (As) ****	mg/kg	maks.0,1	maks.0,1	maks.0,1	maks.0,1
9	Cemaran mikroba					
9.1	Angka lempeng total (ALT)	koloni/g	maks.1x10 ⁴	maks.1x10 ⁴	maks.1x10 ⁴	maks.1x10 ⁴
9.2	Bakteri <i>coliform</i>	APM/g atau koloni/g	maks.10	maks.10	maks.10	maks.10
9.3	<i>Salmonella</i>	-	negatif/25 g	negatif/25 g	negatif/25 g	negatif/25 g

Tabel 1 - Syarat mutu susu kental manis (lanjutan)

No.	Kriteria uji	Satuan	Persyaratan			
			Susu kental manis	Susu skim kental manis	Susu skim sebagian kental manis	Susu kental manis tinggi lemak
9.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	koloni/g	maks.1x10 ²	maks.1x10 ²	maks.1x10 ²	maks.1x10 ²
9.5	Kapang dan khamir	koloni/g	maks.2x10 ²	maks.2x10 ²	maks.2x10 ²	maks.2x10 ²
* untuk produk susu kental manis tanpa penambahan perisa ** untuk produk susu kental manis dengan penambahan perisa *** untuk kemasan kaleng **** dihitung terhadap produk siap konsumsi						

6 Pengambilan contoh

Cara pengambilan contoh sesuai dengan SNI 0428.

7 Cara uji

Cara uji susu kental manis seperti di bawah ini:

- 1 Persiapan contoh sesuai Lampiran A.1
- 2 Cara uji keadaan sesuai Lampiran A.2
- 2.1 Cara uji bau sesuai Lampiran A.2.1
- 2.2 Cara uji rasa sesuai Lampiran A.2.2
- 3 Cara uji kadar air sesuai Lampiran A.3
- 4 Cara uji lemak sesuai Lampiran A.4
- 5 Cara uji protein sesuai Lampiran A.5
- 6 Cara uji total gula dihitung sebagai sakarosa sesuai Lampiran A.6
- 7 Cara uji padatan susu sesuai Lampiran A.7
- 8 Cara uji cemaran logam sesuai Lampiran A.8
- 8.1 Cara uji timbal (Pb) sesuai Lampiran A.8.1
- 8.2 Cara uji timah (Sn) sesuai Lampiran A.8.2
- 8.3 Cara uji merkuri (Hg) sesuai Lampiran A.8.3
- 9 Cara uji arsen (As) sesuai Lampiran A.9
- 10 Cara uji cemaran mikroba sesuai Lampiran A.10
- 10.1 Persiapan dan homogenisasi contoh sesuai Lampiran A.10.1
- 10.2 Cara uji angka lempeng total sesuai Lampiran A.10.2
- 10.3 Cara uji bakteri *coliform* sesuai Lampiran A.10.3
- 10.3.1 Cara uji bakteri *coliform* metode APM (Angka Paling Mungkin) sesuai Lampiran A.10.3.1
- 10.3.2 Cara uji bakteri *coliform* metode tuang sesuai Lampiran A.10.3.2
- 10.4 Cara uji *Salmonella* sesuai Lampiran A.10.4
- 10.5 Cara uji *Staphylococcus aureus* sesuai Lampiran A.10.5
- 10.6 Cara uji kapang dan khamir sesuai Lampiran A.10.6

8 Syarat lulus uji

Produk dinyatakan lulus uji apabila memenuhi syarat mutu sesuai Pasal 5.

9 Higiene

Cara memproduksi produk yang higienis termasuk cara penyiapan dan penanganannya mengacu pada peraturan yang berlaku tentang Pedoman Cara Produksi Pangan Olahan yang Baik.

10 Pengemasan

Susu kental manis dikemas dalam wadah yang tertutup rapat, tidak dipengaruhi atau mempengaruhi isi, aman selama penyimpanan dan pengangkutan.

11 Syarat penandaan

Syarat penandaan sesuai dengan ketentuan tentang label dan iklan pangan.



Lampiran A (normatif) Cara uji susu kental manis

A.1 Persiapan contoh

Persiapan contoh terdiri atas persiapan contoh untuk uji mikrobiologi, uji organoleptik, dan analisis kimia. Pengambilan contoh untuk uji mikrobiologi dilakukan pertama, kemudian dilanjutkan dengan pengambilan contoh untuk uji organoleptik dan analisis kimia.

A.1.1 Persiapan contoh untuk uji mikrobiologi

Buka kemasan susu kental manis dan ambil contoh susu kental manis sesuai yang diperlukan minimum 200 g secara aseptik dengan menggunakan sendok steril kemudian tempatkan dalam botol contoh steril.

A.1.2 Persiapan contoh untuk uji organoleptik

Buka kemasan susu kental manis dan ambil contoh secukupnya untuk keperluan tersebut.

A.1.3 Persiapan contoh untuk analisis kimia

Buka kemasan susu kental manis **dan secara hati-hati** ambil contoh sesuai yang diperlukan minimum 200 g menggunakan sendok bersih dan kering, kemudian tempatkan dalam botol contoh. Jika ukuran kemasan kurang dari 200 g, maka ambil beberapa kemasan sehingga jumlahnya mencapai 200 g.

A.2 Keadaan

A.2.1 Bau

A.2.1.1 Prinsip

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera penciuman (hidung).

A. 2.1.2 Cara kerja

- Ambil contoh uji sebanyak 5 g dan letakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering;
- cium contoh uji untuk mengetahui baunya; dan
- lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis terlatih dan kompeten atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.1.3 Cara menyatakan hasil

- Jika tercium bau khas susu kental manis, maka hasil dinyatakan "**normal**";
- jika tercium bau asing selain bau khas susu kental manis, maka hasil dinyatakan "**tidak normal**".

A.2.2 Rasa

A.2.2.1 Prinsip

Melakukan analisis terhadap contoh uji secara organoleptik dengan menggunakan indera perasa (lidah).

A.2.2.2 Cara kerja

- Ambil kira-kira 1 sendok contoh uji dan rasakan dengan lidah; dan
- lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.2.3 Larutan susu kental manis

- Buat larutan susu kental manis sesuai syarat saji yang tertera pada kemasan di dalam gelas yang bersih dan kering;
- ambil kira-kira 1 sendok larutan susu kental manis dan rasakan dengan lidah; dan
- lakukan pengerjaan minimal oleh 3 orang panelis atau 1 orang tenaga ahli.

A.2.2.4 Cara menyatakan hasil

- Jika terasa khas susu kental manis, maka hasil dinyatakan "**normal**";
- jika terasa rasa asing selain rasa khas susu kental manis, maka hasil dinyatakan "**tidak normal**".

A.3 Kadar air

A.3.1 Prinsip

Kadar air dihitung berdasarkan bobot yang hilang selama pemanasan dalam oven pada suhu $(102 \pm 2) ^\circ\text{C}$.

A.3.2 Peralatan

- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg.
- oven terkalibrasi dengan ketelitian $1 ^\circ\text{C}$;
- desikator yang berisi desikan; dan
- cawan pengering terbuat dari nikel, platina, atau aluminium dengan penutup;

A.3.3 Cara kerja

- Panaskan cawan beserta tutupnya dalam oven pada suhu $(102 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama lebih kurang satu jam dan dinginkan dalam desikator selama 20 menit sampai dengan 30 menit, kemudian timbang dengan neraca analitik (cawan dan tutupnya) (W_0);
- masukkan 5 g contoh ke dalam cawan, tutup, dan timbang (W_1);
- panaskan cawan yang berisi contoh tersebut dalam keadaan terbuka dengan meletakkan tutup cawan di samping pinggan di dalam oven pada suhu $(102 \pm 2) ^\circ\text{C}$ selama 2 (dua) jam setelah suhu oven $(102 \pm 2) ^\circ\text{C}$;
- tutup cawan ketika masih di dalam oven, pindahkan segera ke dalam desikator dan dinginkan selama 20 menit sampai dengan 30 menit, kemudian timbang;
- lakukan pemanasan kembali selama 1 jam dan ulangi kembali sampai perubahan berat antara pemanasan selama 1 jam mempunyai interval $\leq 2 \text{ mg}$ (W_2);
- lakukan pekerjaan duplo; dan
- hitung kadar air dalam contoh.

A.3.4 Perhitungan

$$\text{Kadar Air} = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

dengan;

W_0 adalah bobot cawan kosong dan tutupnya, (g);

W_1 adalah bobot cawan, tutupnya dan contoh sebelum dikeringkan, (g);

W_2 adalah bobot cawan, tutupnya dan contoh setelah dikeringkan, (g).

A.3.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar air atau deviasi (RSD) maksimal 3 %. Jika kisaran lebih besar dari nilai 5 % atau deviasi lebih besar dari 3 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.4 Lemak

A.4.1 Prinsip

Lemak dalam contoh dihidrolisa dengan amonia dan alkohol kemudian diekstraksi dengan eter. Ekstrak eter yang diperoleh kemudian diuapkan sampai kering dalam cawan alumunium dan kadar lemak dihitung secara gravimetri.

A.4.2 Peralatan

- Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- penangas air;
- labu ekstraksi/ labu lemak *Majonnier*;
- sentrifuse;
- oven atau oven vakum terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- desikator yang berisi desikan;
- pipet volumetrik 25 ml terkalibrasi ;
- cawan aluminium;
- gelas ukur terkalibrasi;
- tang/penjepit; dan
- tutup labu.

A.4.3 Perekasi

- Air suling;
- amonium hidroksida pekat;
- indikator fenolftalein 0,5 %;
- etil alkohol 95 %;
- etil eter, bebas peroksida; dan
- petroleum eter.

A.4.4 Cara kerja

- Timbang 5 g sampai dengan 10 g (W) contoh susu kental manis ke dalam labu ekstraksi dan panaskan jika diperlukan;

- b) tambahkan 1 ml sampai dengan 1,25 ml amonium hidroksida pekat, panaskan dalam penangas air pada suhu 60 °C sampai dengan 70 °C selama 15 menit, diaduk beberapa kali dan dinginkan;
- c) tambahkan 3 tetes indikator fenolftalein, 10 ml alkohol 95 %, tutup labu ekstraksi, dan aduk selama 15 detik;
- d) untuk ekstraksi pertama; tambahkan 25 ml etil eter, tutup labu ekstraksi, dan kocok dengan kuat selama 1 menit;
- e) tutup labu ekstraksi sesekali dilonggarkan apabila diperlukan;
- f) tambahkan 25 ml petroleum eter, tutup labu ekstraksi, dan kocok dengan kuat selama 1 menit;
- g) longgarkan sesekali tutup labu ekstraksi apabila diperlukan;
- h) sentrifuse labu tersebut pada 600 rpm selama 30 detik sehingga terjadi pemisahan yang jelas antara fase air dan eter;
- i) tuangkan lapisan eter dengan hati-hati kedalam labu lemak atau cawan alumunium kosong yang telah diketahui bobotnya (W_0);
- j) lapisan air digunakan untuk ekstraksi berikutnya;
- k) untuk ekstraksi kedua, ulangi cara kerja c sampai dengan j dengan penambahan 5 ml alkohol 95 %, 15 ml etil eter dan 15 ml petroleum eter;
- l) untuk ekstraksi ketiga, ulangi cara kerja c sampai dengan j tanpa penambahan alkohol 95 %, 15 ml etil eter dan 15 ml petroleum eter (ekstraksi ke-3 tidak perlu dilakukan untuk susu skim kental manis);
- m) uapkan pelarut di atas penangas air dan keringkan labu lemak/cawan aluminium yang berisi ekstrak lemak tersebut dalam oven pada suhu $(100 \pm 1)^\circ\text{C}$ selama 30 menit atau oven vakum pada suhu 70 °C sampai dengan 75 °C dengan tekanan <50 mm Hg (6,7 KPa); dan
- n) dinginkan dalam desikator dan timbang hingga bobot tetap (W_1).

A.4.5 Perhitungan

$$\text{Lemak (\%)} = \frac{W_1 - W_0}{W} \times 100 \%$$

dengan;

W adalah bobot contoh, (g);

W_0 adalah bobot labu lemak/cawan aluminium kosong, (g);

W_1 adalah bobot labu lemak/cawan aluminium kosong dan lemak, (g).

A.4.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10 % dari nilai rata-rata hasil lemak atau deviasi (RSD) maksimal 4%. Jika kisaran lebih besar dari 10 % atau RSD lebih besar dari 4%, maka analisis harus diulang kembali.

A.5 Protein (N×6,38)

A.5.1 Prinsip

Contoh uji didestruksi dengan H_2SO_4 menggunakan $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ sebagai katalis dan K_2SO_4 untuk meningkatkan titik didihnya bertujuan melepaskan nitrogen dari protein sebagai garam amonium. Garam amonium tersebut diuraikan menjadi NH_3 pada saat destilasi menggunakan NaOH . NH_3 yang dibebaskan dan diikat dengan asam borat menghasilkan ammonium borat yang secara kuantitatif dititrasi dengan larutan baku asam sehingga

diperoleh total nitrogen. Kadar protein susu diperoleh dari hasil perkalian total nitrogen dengan faktor 6,38.

A.5.2 Peralatan

- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- Labu *Kjeldahl* 100 ml;
- Alat penyuling dan kelengkapannya;
- alat destruksi dilengkapi dengan penghisap asap;
- buret 10 ml terkalibrasi; dan
- batu didih.

A.5.3 Pereaksi

- Asam sulfat, H_2SO_4 pekat bebas nitrogen;
- larutan katalis tembaga, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ bebas nitrogen 0,05 g/ml H_2O ;
larutkan 5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dengan air suling menjadi 100 ml, lalu pindahkan ke dalam botol bertutup gelas
- katalis selen;
campurkan 4 g serbuk SeO_2 , 150 g K_2SO_4 atau Na_2SO_4 dan 30 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
- kalium sulfat, K_2SO_4 bebas nitrogen;
- batu didih;
- larutan indikator *methyl red* (MR)/*bromocresol green* (BCG);
larutkan 0,2 g *methyl red* dengan etanol 95 % menjadi 100 ml. Larutkan 1,0 g *bromocresol green* dengan etanol 95 % menjadi 500 ml. Campurkan 1 bagian larutan *methyl red* dan 5 bagian larutan *bromocresol green* dalam gelas piala lalu pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- larutan asam borat, H_3BO_3 4 %;
larutkan 40 g H_3BO_3 dengan air suling menjadi 1 000 ml dan tambahkan 3 ml larutan indikator *methyl red*/*bromocresol green*, aduk, (larutan akan berwarna kuning terang) dan pindahkan ke dalam botol bertutup gelas.
- larutan natrium hidroksida, NaOH 30 %;
larutkan 600 g hablur NaOH dengan air suling menjadi 2 000 ml, simpan ke dalam botol bertutup karet.
- larutan indikator fenolftalein (PP) 1 %; dan
larutkan 1 g serbuk indikator PP dengan alkohol 95 % dan encerkan menjadi 100 ml.
- larutan asam klorida, HCl 0,1000 M.
pipet dengan hati-hati 8,60 ml HCl pekat (36,5 % sampai dengan 38 %) kedalam labu ukur 1 L dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan ditetapkan normalitasnya.

A.5.4 Cara kerja

- Timbang 1 g contoh (W) ke dalam labu *Kjeldahl*, tambahkan 15,00 g K_2SO_4 , 1 ml larutan katalis $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ atau 1 g campuran katalis selen, 8 sampai dengan 10 batu didih dan 25 ml H_2SO_4 pekat;
- panaskan campuran dalam pemanas listrik sampai mendidih dan larutan menjadi jernih kehijau-hijauan. Lakukan dalam lemari asam atau lengkapi alat destruksi dengan unit pengisapan asap;
- biarkan dingin, kemudian encerkan dengan air suling secukupnya;
- tambahkan 75 ml larutan NaOH 30 % (periksa dengan indikator PP sehingga campuran menjadi basa);
- suling selama 5 menit sampai dengan 10 menit atau saat larutan destilat telah mencapai kira-kira 150 ml, dengan penampung destilat adalah 50 ml larutan H_3BO_3 4 %;

- f) bilas ujung pendingin dengan air suling;
- g) titar larutan campuran destilat dengan larutan HCl 0,100 0 M; dan
- h) kerjakan penetapan blanko.

A.5.5 Perhitungan

$$\text{Kadar protein (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 14,007 \times 6,38 \times 100 \%}{W}$$

dengan:

- V_1 adalah volume HCl 0,100 0 N untuk titrasi contoh, (ml);
- V_2 adalah volume HCl 0,100 0 N untuk titrasi blanko, (ml);
- N adalah normalitas larutan HCl;
- W adalah bobot contoh (mg);
- 14,007 adalah bobot atom Nitrogen;
- 6,38 adalah faktor protein untuk susu.

A.5.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 10 % dari nilai rata-rata hasil kadar protein atau deviasi (RSD) maksimal 4 %. Jika kisaran lebih besar dari 10 % atau RSD lebih besar dari 4 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.6 Total gula dihitung sebagai sakarosa

A.6.1 Prinsip

Sakarosa dihidrolisa menjadi gula pereduksi. Jumlah gula pereduksi dapat mereduksi Cu^{2+} menjadi Cu^+ . Kelebihan Cu^{2+} dititrasi dengan cara iodometri. Jumlah Cu^{2+} ditetapkan pada titrasi blanko. Perbedaan antara penitrasi blanko dan contoh dapat dihitung sebagai jumlah gula pereduksi (menggunakan Tabel B.1)

A.6.2 Peralatan

- a) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- b) erlenmeyer 500 ml terkalibrasi;
- c) pipet volumetrik 10 ml, 25 ml, dan 50 ml terkalibrasi;
- d) labu ukur 100 ml, 250 ml, dan 1 000 ml terkalibrasi;
- e) buret 50 ml terkalibrasi;
- f) penangas listrik;
- g) penangas air;
- h) pendingin tegak;
- i) termometer terkalibrasi;
- j) batu didih; dan
- k) *stopwatch*.

A.6.3 Pereaksi

- a) larutan *Luff Schoorl*;
 - larutkan 143,8 g Na_2CO_3 anhidrat dalam kira-kira 300 ml air suling. Sambil diaduk, tambahkan 50 g asam sitrat yang telah dilarutkan dengan 50 ml air suling.
 - tambahkan 25 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ yang telah dilarutkan dengan 100 ml air suling.
 - pindahkan larutan tersebut ke dalam labu ukur 1 liter, tepatkan larutan sampai tanda garis dengan air suling dan kocok.
 - biarkan semalam dan saring bila perlu. Larutan ini mempunyai kepekatan Cu^{2+} 0,2 N dan Na_2CO_3 2 M.

- b) larutan kalium iodida, KI 20 %;
larutkan 20 g kalium iodida p.a. dengan air suling hingga 100 ml.
- c) larutan asam sulfat, H_2SO_4 25 % dan 3 M;
- H_2SO_4 25 %;
larutkan 138 ml H_2SO_4 p.a. (98 %, b.j. 1,84) dengan 745 ml air suling.
- H_2SO_4 3 M;
larutkan 84 ml H_2SO_4 p.a. (98 %, b.j. 1,84) dengan air suling hingga 1 L.
- d) larutan natrium tiosulfat, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 N;
- larutkan 100 ml larutan natrium tiosulfat 1 N dengan air suling bebas CO_2 menjadi 1 L;
- pembuatan natrium tiosulfat 1 N;
larutkan 248 g natrium tiosulfat 5 H_2O dengan air suling bebas CO_2 (yang sudah dididihkan terlebih dahulu) sehingga 1 L.
- standardisasi natrium tiosulfat 0,1 N.
- e) larutan asam klorida, HCl 25 % dan 4 N;
- HCl 25%;
640 mL HCl p.a. (\pm 37 %, b.j. 1,19) diencerkan dengan air suling hingga 1 L.
- HCl 4 N;
356 ml HCl p.a. (\pm 37 %, b.j. 1,19) diencerkan dengan air suling hingga 1 L.
- f) indikator kanji 0,5%;
larutkan 0,50 g amilum dengan air panas menjadi 100 ml.
- g) larutan natrium hidroksida, NaOH 0,1 M;
- h) larutan indikator fenolftalen 1%;
larutkan 1 g fenolftalein p.a. dengan alkohol 60 % hingga 100 ml.
- i) larutan seng asetat, $(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 3 N; dan
timbang 55 g Zn asetat 2 H_2O , kemudian larutkan dengan air suling menjadi 100 ml.
- j) larutan kalium ferisianida, $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0,5 N.
larutkan 5,3 g kalium ferisianida dengan air suling hingga 100 ml.

A.6.4 Cara kerja

- a) Timbang 2 g sampai dengan 3 g contoh (W) dan masukkan ke dalam labu ukur 250 ml, tambahkan air dan kocok;
- b) tambahkan 4 ml Zn asetat dan kocok;
- c) tambahkan 4 ml larutan kalium ferisianida. Apabila tidak timbul endapan berarti penambahan $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 0,5 N sudah cukup;
- d) goyangkan dan tepatkan isi labu ukur sampai tanda garis dengan air suling dan kocok, biarkan kira-kira 30 menit dan saring;
- e) pipet 50 ml hasil penyaringan ke dalam labu ukur 100 ml;
- f) tambahkan 5 ml HCl 25%, hidrolisis dalam penangas air suhu 68 °C sampai dengan 70°C selama 10 menit (menggunakan *stopwatch*);
- g) angkat labu ukur dan termometer dibilas dengan air dan dinginkan;
- h) pipet 25 ml larutan *Luff Schoorl* ke dalam Erlenmeyer 500 ml tertutup asah, tambahkan 10 ml larutan hasil saringan (dengan menggunakan pipet) dan 15 ml air suling agar volume menjadi 50 ml serta beberapa butir batu didih;
- i) pemipetan contoh dapat diperkecil dan atau diperbesar tergantung dari kandungan gula pereduksi dalam contoh. Apabila terbentuk endapan merah dan warna biru dari larutan hilang, perkecil pemipetan. Sebaliknya apabila endapan merah tidak terbentuk sama sekali, perbesar pemipetan. Penambahan air diatur sehingga volume akhir 50 ml;
- j) hubungkan Erlenmeyer dengan pendingin tegak, panaskan diatas pemanas listrik, usahakan dalam waktu 3 menit sudah mulai mendidih;
- k) panaskan terus selama 10 menit (pakai *stopwatch*) kemudian angkat dan segera dinginkan dalam bak berisi es (jangan digoyang, apabila warna biru dari larutan *Luff Schoorl* habis, maka pemipetan larutan contoh diperkecil/diulang);

- l) setelah dingin tambahkan 10 ml larutan KI 20% dan 25 ml larutan H₂SO₄ 25% (hati-hati terbentuk gas CO₂);
- m) titar dengan larutan natrium tio sulfat 0,1 N dan tambahkan 2 ml sampai dengan 3 ml indikator larutan kanji 0,5% (V₁);
- n) lakukan penetapan blanko, pipet 25 ml larutan *Luff Schoorl* dan tambahkan 25 ml air suling, kerjakan seperti diatas (V₂);
- o) kerjakan penetapan duplo; dan
- p) hitung sakarosa dengan menggunakan tabel B.1

A.6.5 Perhitungan

Total gula dihitung sebagai sakarosa (%) = 0.95 x % gula sesudah inversi dengan:

$$\text{Gula sesudah inversi (\%)} = \frac{W_1 \times fp}{W} \times 100\%$$

dengan:

W₁ adalah bobot glukosa, berdasarkan Tabel B.1, (mg);

Jumlah natrium tiosulfat 0,1 N yang diperlukan untuk mencari bobot glukosa dalam tabel adalah pengurangan volume titar blanko dengan volume titar contoh (V₂ sampai dengan V₁);

fp adalah faktor pengenceran;

W adalah bobot contoh, (mg).

A.6.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan maksimal 5 % dari nilai rata-rata hasil kadar sakarosa atau deviasi (RSD) maksimal 3 %. Jika kisaran lebih besar dari 5 % atau RSD lebih besar dari 3 %, maka analisis harus diulang kembali.

Tabel A.1 - Ekuivalen natrium tiosulfat pada penetapan total gula cara Luff-Schoorl

Na ₂ S ₂ O ₃ 0,1 M (ml)	Gula pereduksi Glukosa (mg)
1	2,4
2	4,8
3	7,2
4	9,7
5	12,2
6	12,7
7	17,2
8	19,8
9	22,4
10	25,0
11	27,6
12	30,3
13	33,0
14	35,7

Tabel A.1 (Lanjutan)

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,1 M (ml)	Gula pereduksi Glukosa (mg)
15	38,5
16	41,3
17	44,2
18	47,1
19	50,0
20	53,0
21	56,0
22	59,1
23	62,2

A.7 Padatan susu

A.7.1 Prinsip

Padatan susu adalah pengurangan total padatan dengan total gula.

A.7.2 Penetapan total padatan

A.7.2.1 Prinsip

Total padatan dihitung sebagai bobot contoh yang tersisa setelah pemanasan dalam oven pada suhu $(100 \pm 1)^\circ\text{C}$ selama 4 jam.

A.7.2.2 Peralatan

- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- penangas air;
- oven terkalibrasi.
- Pinggan untuk menimbang berdiameter 5 cm;
- desikator berisi desikan silika;
- tang/penjepit; dan

A.7.2.3 Cara kerja

- Timbang pinggan/kotak timbang yang sebelumnya telah dipanaskan di dalam oven $(100 \pm 1)^\circ\text{C}$ selama ≥ 2 jam (W). Timbang 1 buah pinggan kosong sebagai blanko (B_1), kemudian pinggan kosong dipanaskan pada oven suhu $(100 \pm 1)^\circ\text{C}$ selama ≥ 2 jam, sebagai blanko (B_2);
- timbang 3 g contoh yang sudah dipanaskan pada $(38 \pm 1)^\circ\text{C}$ ke dalam pinggan tadi (W_1);
- masukkan pinggan berisi contoh dan pinggan kosong ke dalam oven dan keringkan selama 4 jam pada suhu $(100 \pm 1)^\circ\text{C}$ (selama pengeringan pintu oven jangan dibuka); dan

- d) pindahkan piringan dalam desikator dan biarkan dingin pada suhu kamar (30 menit) kemudian timbang (W_2).

A.7.2.4 Perhitungan

$$\text{Total padatan (\%)} = \frac{(W_1 - W_2) - (B_1 - B_2)}{W_1 - W} \times 100 \%$$

dengan :

- W adalah berat piringan, (g);
 W_1 adalah berat piringan + contoh susu, (g);
 W_2 adalah berat piringan + susu kering, (g);
 B_1 adalah berat blanko sebelum dipanaskan, (g);
 B_2 adalah berat blanko sesudah dipanaskan, (g).

A.7.2.5 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan disarankan maksimal 0,05 % dari nilai rata-rata hasil total padatan.

A.7.3 Padatan susu

Perhitungan

Padatan susu (%) = total padatan (%) - total gula dihitung sebagai sakarosa (%) (B.6.5)

A.8 Cemarkan logam

A.8.1 Penetapan cemarkan logam timbal (Pb)

A.8.1.1 Prinsip

Peleburan contoh dengan cara pengabuan kering pada 500 °C yang dilanjutkan dengan pelarutan dalam larutan asam. Logam yang terlarut dihitung menggunakan alat Spektrofotometer Serapan Atom (SSA).

A.8.1.2 Peralatan

- SSA terkalibrasi dilengkapi lampu katoda Pb;
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- penangas listrik;
- cawan porselin/platina/kwarsa dengan kapasitas 50 ml sampai dengan 100 ml;
- kertas saring tara jumlah yang tidak berabu (*Whatman* no. 41 atau setara)
- pipet ukur berskala 0,05 atau mikro buret terkalibrasi;
- labu ukur 50 ml, 100 ml, dan 1 000 ml, terkalibrasi;
- gelas ukur kapasitas 10 ml terkalibrasi;
- gelas piala 250 ml; dan
- penangas air.

A.8.1.3 Pereaksi

- Larutan asam nitrat, HNO_3 pekat (65 %, Bj. 1,4);

- b) larutan asam klorida, HCl pekat (37 %, Bj. 1,19);
- c) larutan asam nitrat, HNO_3 0,1 N;
encerkan 7 ml HNO_3 65 % dengan air suling dalam labu ukur 1 000 ml dan encerkan sampai tanda garis.
- d) larutan asam klorida, HCl 6 N;
encerkan 500 ml HCl 37 % dengan air suling dalam labu ukur 1 000 ml dan encerkan sampai tanda garis.
- e) larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 % dalam alkohol;
larutkan 10 g $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dengan alkohol 95 % menjadi 100 ml.
- f) larutan baku 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pb;
pipet 1, 000 g Pb dengan 7 ml HNO_3 pekat dalam gelas piala 250 ml dan masukan ke dalam labu ukur 1 000 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Alternatif lain, bisa digunakan larutan baku Pb 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ siap pakai.
- g) larutan baku 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pb; dan
pipet 5,0 ml larutan baku 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pb ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi Pb 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.
- h) larutan baku kerja Pb.
pipet ke dalam labu ukur 100 ml masing-masing sebanyak 0 ml; 0,2 ml; 0,5 ml; 1 ml; 2 ml; 3 ml dan 4 ml larutan baku 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kemudian tambahkan 5 ml larutan HNO_3 1 N atau HCl 6 N, dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ dan 2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pb.

A.8.1.4 Cara kerja

- a) Timbang dengan teliti 5 g sampai dengan 10 g contoh dalam cawan porselin/platina/kuarsa (m);
- b) tempatkan cawan berisi contoh uji di atas penangas listrik dan panaskan secara bertahap sampai contoh uji menjadi arang dan tidak berasap lagi; (bisa ditambahkan 10 ml $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10% dalam alkohol untuk mempercepat pengabuan);
- c) lanjutkan pengabuan dalam tanur (500 ± 5) °C sampai abu berwarna putih, bebas dari karbon;
- d) apabila abu belum bebas dari karbon yang ditandai dengan warna keabu-abuan, basahkan dengan beberapa tetes air dan tambahkan tetes demi tetes HNO_3 pekat kira-kira 0,5 ml sampai dengan 3 ml;
- e) keringkan cawan di atas penangas listrik dan masukkan kembali ke dalam tanur pada suhu 500 °C kemudian lanjutkan pemanasan sampai abu menjadi putih. Penambahan HNO_3 pekat dapat diulangi apabila abu masih berwarna keabu-abuan;
- f) larutkan abu berwarna putih dalam 5 ml HCl 6 N atau 5 ml HNO_3 1 N sambil dipanaskan di atas penangas listrik atau penangas air selama 2 menit sampai dengan 3 menit dan masukkan ke dalam labu ukur 50 ml kemudian tepatkan hingga tanda garis dengan air suling (V) (jika perlu, saring larutan menggunakan kertas saring *Whatman* no. 41);
- g) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- h) baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum sekitar 283 nm untuk Pb);
- i) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi logam ($\mu\text{g}/\text{ml}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi; dan
- k) hitung kandungan logam dalam contoh.

A.8.1.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan logam (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

dengan:

C adalah konsentrasi logam dari kurva kalibrasi, (µg/ml);

V adalah volume larutan akhir, (ml);

m adalah bobot contoh, (g).

A.8.1.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 16%. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang.

A.8.2 Penetapan timah (Sn)**A.8.2.1 Prinsip**

Contoh didekstruksi dengan HNO₃ dan HCl kemudian tambahkan KCl untuk mengurangi gangguan. Sn dibaca menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi N₂O-C₂H₂.

A.8.2.2 Peralatan

- a) SSA terkalibrasi beserta kelengkapan lampu katoda Sn;
- b) Neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- c) erlenmeyer 250 ml;
- d) tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1 °C;
- e) penangas listrik;
- f) kertas saring tara pangan yang tidak berabu (*Whatman* no. 41 atau setara);
- g) pipet ukur berskala 0,1 kapasitas 5 ml dan 10 ml terkalibrasi;
- h) labu ukur 50 ml, 100 ml, dan 1 000 ml, terkalibrasi;
- i) gelas ukur kapasitas 50 ml terkalibrasi;
- j) gelas piala 250 ml; dan
- k) penangas air.

A.8.2.3 Pereaksi

- a) Larutan kalium, 10 mg/ml K;
larutkan 1,91 g KCl dengan air menjadi 100 ml.
- b) asam nitrat pekat, HNO₃ pekat;
- c) asam klorida pekat, HCl pekat;
- d) larutan baku 1 000 mg/l Sn; dan
larutkan 1,000 g Sn dengan 200 ml asam HCl pekat dalam labu ukur 1 000 ml, tambahkan 200 ml air suling, dinginkan pada suhu ruang dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- e) larutan baku kerja Sn.
pipet 10 ml HCl pekat dan 1,0 ml larutan KCl ke dalam masing-masing labu ukur 100 ml. Tambahkan masing-masing 0; 0,5 ml; 1,0 ml; 1,5 ml; 2,0 ml dan 2,5 ml larutan baku 1 000 mg/l Sn dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0 µg/ml; 5 µg/ml; 10 µg/ml; 15 µg/ml; 20 µg/ml dan 25 µg/ml Sn.

A.8.2.4 Cara kerja

- Timbang 10 g sampai dengan 20 g contoh (m) ke dalam erlenmeyer 250 ml, tambahkan 30 ml HNO₃ pekat, dan biarkan 15 menit;
- panaskan perlahan selama 15 menit di dalam lemari asam, hindari terjadinya percikan yang berlebihan;
- lanjutkan pemanasan sehingga sisa volume 3 ml sampai dengan 6 ml atau sampai contoh mulai kering pada bagian bawahnya, hindari terbentuknya arang;
- angkat erlenmeyer dari penangas listrik, tambahkan 25 ml HCl pekat, dan panaskan sampai selama 15 menit sampai letupan dari uap Cl₂ berhenti;
- tingkatkan pemanasan dan didihkan sehingga sisa volume 10 ml sampai dengan 15 ml;
- tambahkan 40 ml air suling, aduk, dan tuangkan ke dalam labu ukur 100 ml, bilas erlenmeyer tersebut dengan 10 ml air suling;
- tambahkan 1,0 ml KCl, dinginkan pada temperatur ruang, tara dengan air suling, dan saring;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- baca absorbans larutan baku kerja dan larutan contoh terhadap blanko menggunakan SSA pada panjang gelombang maksimum 235,5 nm dengan nyala oksidasi N₂O-C₂H₂;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi Sn (µg/ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan Sn dalam contoh.

A.8.2.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan Sn (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V$$

dengan:

C adalah konsentrasi Sn dari kurva kalibrasi, (µg/ml);

V adalah volume larutan akhir, (ml);

m adalah bobot contoh, (g).

A.8.2.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 16%. Jika RSD lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.

A.8.3 Penetapan merkuri (Hg)

A.8.3.1 Prinsip

Reaksi antara senyawa Hg dengan NaBH₄ atau SnCl₂ dalam keadaan asam akan membentuk gas atomik Hg. Jumlah Hg yang terbentuk sebanding dengan absorbans Hg yang dibaca menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang maksimum 253,7 nm.

A.8.3.2 Peralatan

- SSA terkalibrasi yang dilengkapi lampu katoda Hg dan generator uap hidrida ("HVG");
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- labu destruksi 250 ml berdasar bulat;

- d) pendingin terbuat dari gelas borosilikat, diameter 12 mm sampai dengan 18 mm, tinggi 400 mm diisi dengan cincin *Raschig* tinggi 100 mm, dan dilapisi batu didih diameter 4 mm di atas cincin setinggi 20 mm;
- e) labu ukur 100 ml, 500 ml, dan 1 000 ml terkalibrasi;
- f) penangas listrik;
- g) gelas ukur 25 ml terkalibrasi; dan
- h) pipet ukur berskala 0,05 atau mikroburet terkalibrasi

A.8.3.3 Perekasi

- a) Asam sulfat, H_2SO_4 18 N;
- b) asam nitrat, HNO_3 7 N;
- c) batu didih;
- d) campuran HNO_3 : HClO_4 (1:1);
- e) hidrogen peroksida, H_2O_2 ;
- f) larutan natrium molibdat 2 %;
- g) larutan pereduksi;
campurkan 50 ml H_2SO_4 dengan 300 ml air suling dalam gelas piala 500 ml dan dinginkan sampai suhu ruang kemudian tambahkan 15 g NaCl, 15 g hidroksilamin sulfat, dan 25 g SnCl_2 . Pindahkan kedalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- h) larutan NaBH_4 ;
larutkan 3 g serbuk NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling dalam labu ukur 500 ml.
- i) larutan pengencer;
masukkan 300 ml sampai dengan 500 ml air suling kedalam labu ukur 1 000 ml dan tambahkan 58 ml HNO_3 kemudian 67 ml H_2SO_4 . Encerkan dengan air suling sampai tanda garis dan kocok.
- j) larutan baku 1 000 $\mu\text{g/ml}$ Hg;
larutkan 0,135 4 g HgCl_2 dengan kira-kira 25 ml air suling dalam gelas piala 250 ml dan masukkan ke dalam labu ukur 100 ml kemudian encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- k) larutan baku 1 $\mu\text{g/ml}$ Hg; dan
pipet 1 ml larutan baku 1 000 $\mu\text{g/ml}$ Hg ke dalam labu ukur 1 000 ml dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis kemudian kocok. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g/ml}$.
- l) larutan baku kerja Hg.
pipet masing-masing 0,25 ml; 0,5 ml; 1 ml; dan 2 ml larutan baku 1 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis. Larutan baku kerja ini memiliki konsentrasi 0,002 5 $\mu\text{g/ml}$; 0,005 $\mu\text{g/ml}$; 0,01 $\mu\text{g/ml}$; dan 0,02 $\mu\text{g/ml}$ Hg.

A.8.3.4 Cara kerja

A.8.3.4.1 Pengabuan basah

- a) Timbang 5 g contoh (m) dengan teliti ke dalam labu destruksi dan tambahkan 25 ml H_2SO_4 18 N, 20 ml HNO_3 7 N, 1 ml larutan natrium molibdat 2%, dan 5 batu didih sampai dengan 6 batu didih;
- b) hubungkan labu destruksi dengan pendingin dan panaskan di atas penangas listrik selama 1 jam. Hentikan pemanasan dan biarkan selama 15 menit;
- c) tambahkan 20 ml HNO_3 - HClO_4 (1:1) melalui pendingin;
- d) hentikan aliran air pada pendingin dan panaskan dengan panas tinggi hingga timbul uap putih. Lanjutkan pemanasan selama 10 menit dan dinginkan;
- e) tambahkan 10 ml air melalui pendingin dengan hati-hati sambil labu digoyang-goyangkan;

- f) dididihkan lagi selama 10 menit;
- g) matikan pemanas dan cuci pendingin dengan 15 ml air suling sebanyak 3 kali kemudian dinginkan sampai suhu kamar;
- h) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 100 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- i) pipet 25 ml larutan di atas ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan larutan pengencer sampai tanda garis;
- j) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- k) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja Hg, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat HVG;
- l) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- m) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi Hg ($\mu\text{g/ml}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- n) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- o) lakukan pengerjaan duplo; dan
- p) hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.8.3.4.2 Destruksi menggunakan *microwave* atau destruksi sistem tertutup

- a) Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 ml HNO_3 , 1 ml H_2O_2 kemudian tutup rapat;
- b) masukkan ke dalam *microwave digester* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- c) pindahkan larutan destruksi contoh ke dalam labu ukur 50 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- d) siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- e) tambahkan larutan pereduksi ke dalam larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- f) baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 253,7 nm;
- g) buat kurva kalibrasi antara konsentrasi Hg ($\mu\text{g/ml}$) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- h) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- i) lakukan pengerjaan duplo; dan
- j) hitung kandungan Hg dalam contoh.

A.8.3.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan Hg (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times F_p$$

dengan:

- C adalah konsentrasi Hg dari kurva kalibrasi, ($\mu\text{g/ml}$);
- V adalah volume larutan akhir, (ml);
- m adalah bobot contoh, (g);
- Fp adalah faktor pengenceran.

A.8.3.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 16%. Jika RSD lebih besar dari 16%, maka analisis harus diulang kembali.

A.9 Cemarkan arsen (As)

A.9.1 Prinsip

Contoh didestruksi dengan asam menjadi larutan arsen. Larutan As^{5+} direduksi dengan KI menjadi As^{3+} dan direaksikan dengan NaBH_4 atau SnCl_2 sehingga terbentuk AsH_3 yang kemudian dibaca dengan SSA pada panjang gelombang 193,7 nm.

A.9.2 Peralatan

- SSA terkalibrasi dilengkapi lampu katoda As dan generator uap hidrida ("HVG");
- neraca analitik terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 mg;
- labu *Kjeldahl* 250 ml;
- labu ukur 50 ml, 100 ml, 500 ml, dan 1 000 ml terkalibrasi;
- pemanas listrik;
- pipet volumetrik 25 ml terkalibrasi;
- cawan porselen kapasitas 50 ml.
- gelas ukur 25 ml terkalibrasi;
- tanur terkalibrasi dengan ketelitian 1°C;
- pipet ukur berskala 0,05 ml atau mikroburet terkalibrasi; dan
- labu borosilikat berdasar bulat 50 ml.

A.9.3 Pereaksi

- Asam nitrat, HNO_3 pekat;
- asam perklorat, HClO_4 pekat;
- natrium boronhidrida, NaBH_4 ;
larutkan 3 g NaBH_4 dan 3 g NaOH dengan air suling sampai tanda garis dalam labu ukur 500 ml.
- asam klorida, HCl 8 M;
larutkan 66 ml HCl 37 % kedalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- timah (II) klorida, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 %;
timbang 50 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam piala gelas 200 ml dan tambahkan 100 ml HCl 37 %. Panaskan hingga larutan jernih dan dinginkan, kemudian tuangkan ke dalam labu ukur 500 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- kalium iodida, KI 20 %;
timbang 20 g KI ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis (larutan harus dibuat langsung sebelum digunakan).
- larutan $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 75 mg/ml;
larutkan 3,75 g MgO dengan 30 ml H_2O secara hati-hati, tambahkan 10 ml HNO_3 , dinginkan dan encerkan hingga 50 ml dengan air suling.
- larutan baku 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ As;
larutkan 1,320 3 g As_2O_3 kering dengan sedikit NaOH 20% dan netralkan dengan HCl atau HNO_3 1:1 (1 bagian asam : 1 bagian air). Masukkan ke dalam labu ukur 1 liter dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis.
- larutan baku 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ As;
pipet 10 ml larutan baku arsen 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku kedua ini memiliki konsentrasi 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ As.
- larutan baku 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ As; dan
pipet 1 ml larutan standar arsen 100 mg/l ke dalam labu ukur 100 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis. Larutan baku ketiga ini memiliki konsentrasi 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ As.

- k) larutan baku kerja As.
pipet masing-masing 1,0 ml; 2,0 ml; 3,0 ml; 4,0 ml dan 5,0 ml larutan baku 1 µg/ml As ke dalam labu ukur 100 ml terpisah dan encerkan dengan air suling sampai tanda

A.9.4 Cara kerja

A.9.4.1 Pengabuan basah

- Timbang 5 g - 10 g contoh (m) dalam labu *Kjeldahl* 250 ml, tambahkan 5 ml sampai 10 ml HNO₃ pekat dan 4 ml sampai 8 ml H₂SO₄ pekat dengan hati-hati;
- setelah reaksi selesai, panaskan dan tambahkan HNO₃ pekat sedikit demi sedikit sehingga contoh berwarna coklat atau kehitaman;
- tambahkan 2 ml HClO₄ 20 % sedikit demi sedikit dan panaskan lagi sehingga larutan menjadi jernih atau berwarna kuning (jika terjadi pengarangan setelah penambahan asam perklorat, tambahkan lagi sedikit HNO₃ pekat);
- dinginkan, tambahkan 15 ml H₂O dan 5 ml amonium oksalat jenuh;
- panaskan sehingga timbul uap SO₃ di leher labu;
- dinginkan, pindahkan secara kuantitatif ke dalam labu ukur 50 ml dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- pipet 25 ml larutan di atas dan tambahkan 2 ml HCl, 0,1 ml KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit;
- siapkan larutan blanko dengan penambahan pereaksi dan perlakuan yang sama seperti contoh;
- tambahkan larutan pereduksi (NaBH₄) ke dalam larutan baku kerja As, larutan contoh, dan larutan blanko pada alat "HVG";
- baca absorbans larutan baku kerja, larutan contoh, dan larutan blanko menggunakan SSA tanpa nyala pada panjang gelombang 193,7 nm;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As (µg/ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;
- plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- lakukan pengerjaan duplo; dan
- hitung kandungan As dalam contoh;

A.9.4.2 Destruksi menggunakan *microwave* atau destruksi sistem tertutup

- Timbang 1 g contoh (m) ke dalam tabung destruksi dan tambahkan 5 ml HNO₃, 1 ml H₂O₂ kemudian tutup rapat;
- masukkan ke dalam oven *microwave* dan kerjakan sesuai dengan petunjuk pemakaian alat;
- setelah dingin, pindahkan larutan destruksi ke dalam labu ukur 25 ml secara kuantitatif dan encerkan dengan air suling sampai tanda garis;
- pipet 5 ml sampai dengan 10 ml larutan destruksi (C) ke dalam labu borosilikat berdasar bulat 50 ml, tambah 1 ml larutan Mg(NO₃)₂. Uapkan di atas penangas listrik hingga kering dan arangkan. Abukan dalam tanur pada suhu 450 °C (±1 jam);
- dinginkan dan larutkan dengan 2,0 ml HCl 8 M, 0,1 ml KI 20 % kemudian kocok dan biarkan minimal 2 menit. Tuangkan larutan tersebut ke dalam tabung contoh pada alat;
- siapkan NaBH₄ dan HCl dalam tempat yang sesuai dengan yang ditentukan oleh alat;
- tuangkan larutan baku kerja As 0,01 µg/ml; 0,02 µg/ml; 0,03 µg/ml; 0,04 µg/ml; 0,05 µg/ml serta blanko ke dalam 6 tabung contoh lainnya. Nyalakan *burner* serta tombol pengatur aliran pereaksi dan aliran contoh;
- baca nilai absorbans tertinggi larutan baku kerja As dan contoh dengan blanko sebagai koreksi;
- buat kurva kalibrasi antara konsentrasi As (µg/ml) sebagai sumbu X dan absorbans sebagai sumbu Y;

- j) plot hasil pembacaan larutan contoh terhadap kurva kalibrasi;
- k) lakukan pengerjaan duplo; dan
- l) hitung kandungan As dalam contoh.

A.9.5 Perhitungan

$$\text{Kandungan arsen (mg/kg)} = \frac{C}{m} \times V \times F_p$$

dengan:

C adalah konsentrasi As dari kurva kalibrasi, (µg/ml);

V adalah volume larutan akhir, (ml);

m adalah bobot contoh, (g);

F_p adalah faktor pengenceran.

A.9.6 Ketelitian

Kisaran hasil dua kali ulangan deviasi (RSD) maksimal 16 %. Jika RSD lebih besar dari 16 %, maka analisis harus diulang kembali.

A.10 Cemarkan mikroba

A.10.1 Persiapan dan homogenisasi contoh untuk uji Angka Lempeng Total, bakteri *coliform*, *Staphylococcus aureus* dan kapang/khamir

A.10.1.1 Prinsip

Pembebasan sel-sel bakteri yang mungkin terlindung oleh partikel makanan dan untuk mengaktifkan kembali sel-sel bakteri yang mungkin viabilitasnya berkurang karena kondisi yang kurang menguntungkan dalam makanan. Persiapan dan homogenisasi contoh bertujuan agar bakteri terdistribusi dengan baik di dalam contoh makanan yang ditetapkan.

A.10.1.2 Peralatan

- a) Alat homogenisasi yang sesuai (blender) dengan kecepatan putaran 8 000 rpm sampai dengan 45 000 rpm;
- b) neraca terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- c) gelas piala steril;
- d) labu erlenmeyer steril;
- e) botol pengencer steril;
- f) pipet volumetrik steril terkalibrasi;
- g) tabung reaksi;
- h) alat pembuka kemasan steril;
- i) pisau, sendok, gunting, dan spatula steril;
- j) labu ukur 50 ml, 100 ml, 500 ml, dan 1 000 ml terkalibrasi; dan
- k) penangas listrik.

A.10.1.3 Larutan Pengencer

Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water (BPB);

- KH₂PO₄ 34 g
- air suling 500 ml

Atur pH dengan NaOH sehingga pH 7,2, tepatkan volume sampai 1 000 ml dengan air destilata. Sterilisasi pada suhu 121 °C selama 15 menit. Simpan pada refrigerator untuk membuat larutan pengencer 1,25 ml larutan stok diencerkan dengan air destilata sampai

volume 1 000 ml, kemudian dimasukkan ke dalam tabung sebanyak 90 ml, atau (99 ± 1) ml dan disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit.

A.10.1.4 Homogenisasi contoh

- Timbang 50 g contoh dan masukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi 450 ml larutan pengencer sehingga diperoleh pengenceran 1:10; dan
- kocok campuran beberapa kali sehingga homogen.

A.10.2 Angka lempeng total (metode *plate count*)

A.10.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri mesofil aerob setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang sesuai selama 48 jam pada suhu $(32 \pm 1)^\circ\text{C}$.

A.10.2.2 Peralatan

- Cawan petri gelas / plastik diameter 15 mm x 90 mm steril;
- pipet ukur 1 ml, 5 ml, dan 10 ml terkalibrasi;
- penangas air;
- lemari pengeram (inkubator) terkalibrasi;
- alat penghitung koloni (*colony counter*);
- otoklaf; dan
- oven/alat sterilisasi kering terkalibrasi.

A.10.2.3 Pembenihan dan pengencer

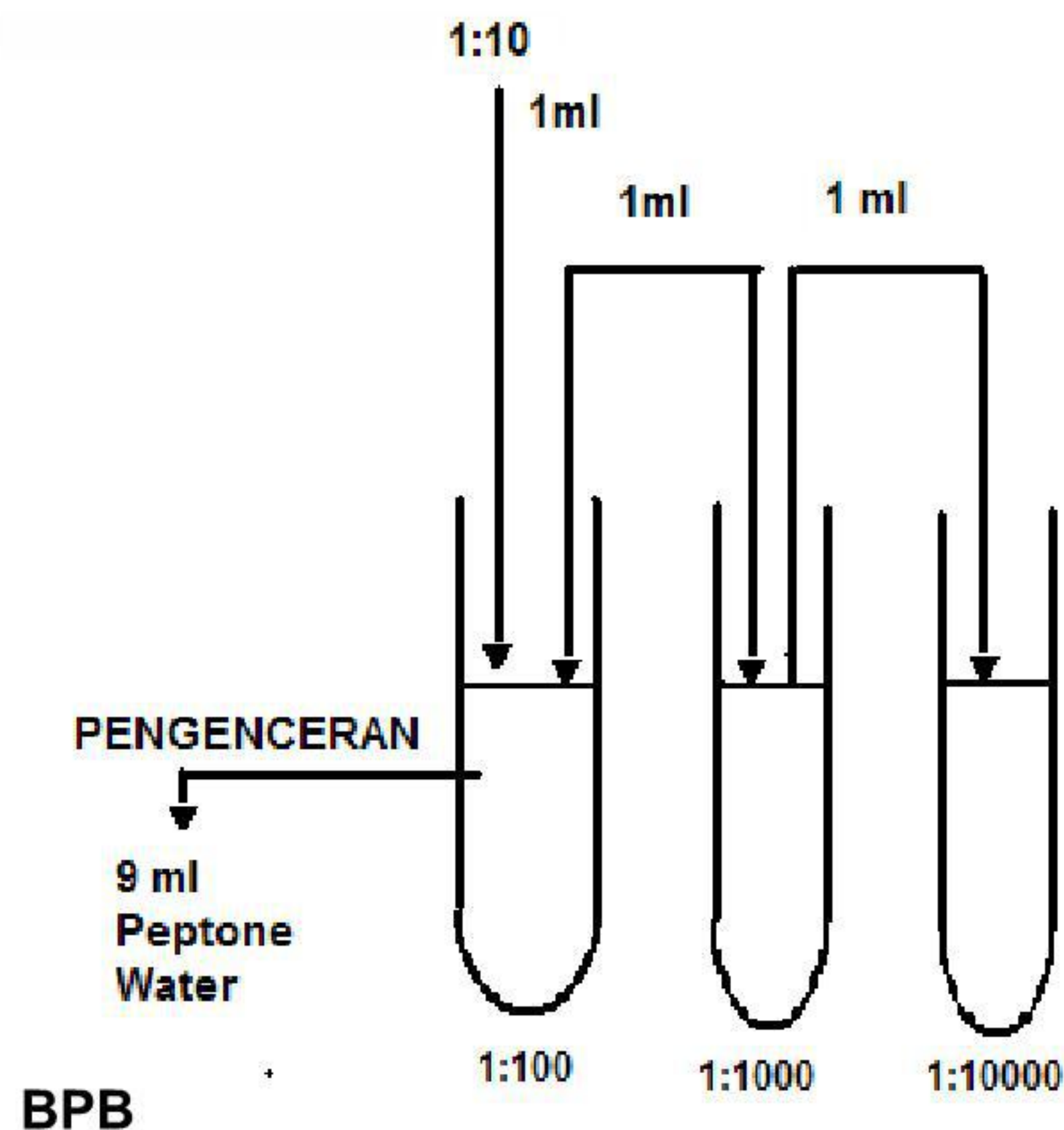
Plate count agar (PCA)

- tryptone	5 g
- yeast extract	2,5 g
- glukosa	1 g
- agar	15 g
- air suling	1 000 ml

Larutkan bahan-bahan di atas menjadi 1000 ml dengan air suling dan atur pH menjadi 7,0. Masukkan ke dalam botol 1 000 ml dan 9 ml ke dalam tabung reaksi. Sterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

A.10.2.4 Cara kerja

- Buat tingkat pengenceran sesuai kebutuhan seperti pada Gambar 1 dengan menggunakan larutan pengencer *Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water* (BPB);



Gambar A.1 - Metoda pengenceran pada penetapan angka lempeng total

- pipet masing-masing 1 ml dari tingkat pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-4} ke dalam cawan petri steril secara duplo;
- tuangkan 12 ml sampai dengan 15 ml media PCA yang masih cair dengan suhu $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ke dalam masing-masing cawan petri;
- goyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga contoh dan pembenihan tercampur merata dan memadat;
- kerjakan inspeksi blanko dengan mencampur air pengencer untuk setiap contoh yang diperiksa;
- biarkan sampai campuran dalam cawan petri memadat;
- masukkan semua cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pengering pada suhu $32 ^\circ\text{C}$ selama (48 ± 2) jam; dan
- catat pertumbuhan koloni pada setiap cawan petri yang mengandung 25 koloni sampai dengan 250 koloni setelah 48 jam.

A.10.2.5 Perhitungan

Angka lempeng total (koloni/g) = $n \times F$

dengan:

n adalah rata-rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran, (koloni/g);

F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

A.10.2.6 Pernyataan hasil

A.10.2.6.1 Cara menghitung

- Pilih cawan petri dari satu pengenceran yang menunjukkan jumlah koloni antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni setiap cawan petri. Hitung semua koloni dalam cawan petri menggunakan alat penghitung koloni. Hitung rata-rata jumlah koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;
- jika salah satu dari dua cawan petri terdapat jumlah koloni lebih kecil dari 25 koloni atau lebih besar dari 250 koloni, hitung jumlah koloni yang terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni dan kalikan dengan faktor pengenceran. Nyatakan hasilnya sebagai jumlah bakteri per gram;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
120	25
105	20

$$ALT = \frac{120 + 105 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 1) \times 10^{-2}]} = 124,9375$$

- c) jika hasil dari dua pengenceran jumlahnya berturut-turut terletak antara 25 koloni sampai dengan 250 koloni, hitung jumlah koloni dari masing-masing pengenceran koloni per g dengan rumus:

$$ALT = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0,1 \times n_2) \times d]}$$

dengan :

C adalah jumlah koloni dari tiap-tiap petri;

n_1 adalah jumlah petri dari pengenceran pertama yang dihitung;

n_2 adalah jumlah petri dari pengenceran kedua;

d adalah pengenceran pertama yang dihitung;

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}
131	30
143	25

$$ALT = \frac{131 + 143 + 30 + 25}{[(1 \times 2) + (0,1 \times 2) \times 10^{-2}]} = 164,3357$$

- d) jika jumlah koloni dari masing-masing petri lebih dari 25 koloni nyatakan sebagai jumlah bakteri perkiraan;
- Jika jumlah koloni per cm^2 kurang dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya sebagai jumlah perkiraan : jumlah bakteri dikalikan faktor pengenceran.

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	Jumlah bakteri perkiraan
~	640	$1000 \times 640 = 640.000 (6,4 \times 10^5)$

- Jika jumlah koloni per cm^2 lebih dari 100 koloni, maka nyatakan hasilnya: area x faktor pengenceran x 100 contoh rata-rata jumlah koloni 110 per cm^2

Contoh :

10^{-2}	10^{-3}	area (cm^2)	jumlah bakteri perkiraan
~	7150	65	$> 65 \times 10^3 \times 100 = > 6500.000 (6,5 \times 10^6)$
~	6490	59	$> 59 \times 10^3 \times 100 = > 5900.000 (5,9 \times 10^6)$

- e) jika jumlah koloni dari masing-masing koloni yang tumbuh pada cawan petri kurang dari 25 koloni, maka nyatakan jumlah bakteri perkiraan lebih kecil dari 25 koloni dikalikan pengenceran yang terendah; dan
- f) menghitung koloni perambat.
- Perambatan pada koloni ada 3 macam, yaitu :
- merupakan rantai yang tidak terpisah;
 - perambatan yang terjadi diantara dasar cawan petri dan pembenihan; dan
 - perambatan yang terjadi pada pinggir atau penukaran pembenihan.

Jika terjadi hanya satu perambatan (seperti rantai) maka koloni dianggap satu. Jika terbentuk satu atau lebih rantai terbentuk dan berasal dari sumber yang terpisah-pisah, maka uap sumber dihitung sebagai satu koloni.

A.10.2.6.2 Cara menghitung dan membulatkan angka

Dalam melaporkan jumlah koloni atau jumlah koloni perkiraan hanya 2 angka penting yang digunakan, yaitu angka pertama dan kedua (dimulai dari kiri),

- e) Jika angka ketiga lebih besar dari 5, maka bulatkan ke atas;
contohnya : 528 dilaporkan sebagai 530 penulisannya $5,3 \times 10^2$
- b) jika angka ketiga kurang dari 5, maka bulatkan kebawah; dan
contohnya : 523 dilaporkan sebagai 520 penulisannya $5,2 \times 10^2$
- c) jika angka ketiga sama dengan 5, maka bulatkan sebagai berikut :
 - bulatkan ke atas jika angka kedua merupakan angka ganjil dan
contohnya : 575 dilaporkan sebagai 580 penulisannya $5,8 \times 10^2$
 - bulatkan ke bawah jika angka kedua merupakan angka genap
contohnya: 565 dilaporkan sebagai 560 penulisannya $5,6 \times 10^2$

A.10.3 Bakteri *coliform*

A.10.3.1 Cara uji bakteri *coliform* metode APM (angka paling mungkin)

A.10.3.1.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *coliform* ditandai dengan terbentuknya gas pada tabung durham, yang diikuti dengan uji biokimia dan selanjutnya dirujuk pada Tabel APM (Angka Paling Mungkin).

A.10.3.1.2 Peralatan

- a) Cawan petri gelas ukuran 15 mm x 100 mm atau plastik ukuran 15 mm x 90 mm, steril;
- b) pipet Mohr 1 ml dan 10 ml berskala;
- c) botol pengenceran (± 20 ml) gelas borosilikat yang resistan, dengan sumbat karet atau tutup uliran;
- d) lemari pengering (inkubator), $(35 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- e) tabung reaksi dan tabung Durham;
- f) rak untuk tabung reaksi terkalibrasi;
- g) jarum inokulasi (ose), dengan diameter dalam kira-kira 3 mm; dan
- h) penangas air tertutup dengan sistem sirkulasi, $(45,5 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$.

A.10.3.1.3 Perbenihan pengencer dan pereaksi

- a) *lauryl sulfate tryptose* (LST) broth/*lauryl tryptose* (LST) broth; dan
- b) *brilliant green lactose bile* (BGLB) broth 2 %.

A.10.3.1.4 Cara kerja

A.10.3.1.4.1 APM - *Presumptive test* untuk bakteri *coliform*

Persiapan contoh uji

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada A.10.1;
- b) inokulasikan masing-masing 1 ml larutan dari setiap tingkat pengenceran (10^{-1} , 10^{-2} dan 10^{-3}) ke dalam tiga tabung *Lauryl sulfate broth*. Pegang pipet sedemikian sehingga ujung bawah pipet menempel pada tabung. Biarkan isi pipet mengalir 2 detik sampai dengan 3 detik. Pipet jangan ditiup untuk mengeluarkan isinya;

- c) masukkan tabung-tabung tersebut ke dalam inkubator pada suhu 35 °C selama (48 ± 2) jam;
- d) amati tabung-tabung tersebut pada pada jam ke-(24 ± 2). Jika ada tabung yang telah mengandung gas, maka tabung tersebut dinyatakan "positif";
- e) tabung-tabung yang belum mengandung gas dinyatakan "negatif", lanjutkan inkubasi selama 24 jam;
- f) catat adanya pembentukan gas dalam jumlah berapapun setelah inkubasi (48 ± 2) jam karena ini adalah *presumptive test* yang positif untuk bakteri coliform untuk tabung-tabung yang negatif; dan
- g) lakukan *confirmed test* terhadap semua tabung yang positif untuk *presumptive test*.

A.10.3.1.4.2 APM – Uji konfirmasi untuk bakteri *coliform* (uji penegasan)

- a) Kocok tabung LST yang positif secara hati-hati dengan cara memutar-mutar tabung;
- b) pindahkan satu mata Ose dari setiap tabung LST yang positif ke dalam tabung BGLB 2 % yang berlainan;
- c) masukkan tabung-tabung BGLB 2% ke dalam inkubator pada suhu 35 °C selama (48 ± 2) jam;
- d) catat semua tabung BGLB yang positif menghasilkan gas dan dengan menggunakan tabel APMTabel 3., tentukan APM berdasarkan jumlah tabung BGLB yang memperlihatkan pembentukan gas dalam jumlah berapapun, selama (48 ± 2) jam pada 35 °C; dan
- e) laporkan sebagai APM bakteri *coliform* per gram.



Tabel A.2 - APM untuk penetapan bakteri *Coliform*

(APM per 1 g contoh bila menggunakan 3 tabung untuk setiap tingkat pengenceran 0,1; 0,01; dan 0,001 g/ml contoh)

Tabung yang positif			APM	Tabung yang positif			APM
0,1	0,01	0,001		0,1	0,01	0,001	
0	0	0	<3	2	2	0	21
0	0	1	3	2	2	1	28
0	1	0	3	2	2	2	35
0	1	1	6	2	3	0	29
0	2	0	6	2	3	1	36
0	3	0	9	3	0	0	23
1	0	0	4	3	0	1	39
1	0	1	7	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160
1	2	1	15	3	2	0	93
1	3	0	16	3	2	1	150
2	0	0	10	3	2	2	216
2	0	1	14	3	2	3	290
2	0	2	20	3	3	0	240
2	1	0	15	3	3	1	460
2	1	1	20	3	3	2	1 100
2	1	2	27	3	3	3	>1 100

A.10.3.2 Cara uji bakteri *coliform* (metode tuang)

A.10.3.2.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *coliform* setelah contoh diinkubasikan dalam pembenihan yang cocok selama 18 jam sampai dengan 24 jam pada suhu 32 °C, kemudian dilakukan uji penegasan menggunakan tabung BGLB *broth*.

A.10.3.2.2 Peralatan

- Cawan petri (90 mm sampai dengan 100 mm);
- pipet ukur 1 ml; dan
- inkubator suhu 32 °C dan 35 °C.

A.10.3.2.3 Perbenihan pengencer dan pereaksi

- Violet red bile agar* (VRBA);

- yeast extract	3	g
- pepton atau gelysate	7	g
- sodium klorida	5	g
- garam bile no.3	1,5	g
- laktosa	10	g
- neutral red	0,03	g
- crystal violet	0,002	g
- agar	15	g
- air suling	1 000	ml

Masukkan bahan-bahan di atas ke dalam 1 000 ml air suling, panaskan sampai mendidih hingga semua bahan larut. Sterilkan pada suhu 121 °C, selama 5 menit dan tepatkan pH akhir ($7,4 \pm 0,2$).

- b) *brilliant green lactose bile* (BGLB) *broth* 2%; dan
- c) *tryptic soy agar*.

A. 10.3.2.4 Cara kerja

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada A.10.1;
- b) inokulasikan masing-masing 1 ml larutan dari setiap tingkat pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} dan 10^{-4} ke dalam cawan petri dan tuang dengan 10 ml VRBA bersuhu 48 °C, kemudian goyang cawan untuk meratakan. Biarkan memadat, kemudian tuang lagi dengan 5 ml VRBA, dinginkan dan biarkan memadat. Lakukan duplo;
- c) jika pengkayaan diperlukan, tuangkan 8 ml sampai dengan 10 ml *tryptic soy agar* sebagai lapisan dasar dan kondisikan suhu 48 °C. Goyang cawan hingga agar rata kemudian inkubasi pada suhu ruang selama ($2 \pm 0,5$) jam. Kemudian lapisi dengan 8 ml sampai dengan 10 ml VRBA cair kemudian diamkan hingga membeku dan memadat;
- d) balikkan cawan dan inkubasikan kembali pada 18 jam sampai dengan 24 jam pada 32 °C;
- e) amati cawan di bawah penyorotan kaca pembesar. Hitung koloni warna ungu kemerahan yang berdiameter 0,5 mm atau lebih besar dan dikelilingi oleh gumpalan asam *bile*. Koloni cawan harus berjumlah sekitar 25 koloni sampai dengan 250 koloni. Kemudian dilanjutkan dengan *confirmed test* (uji penegasan untuk koloni yang positif);
- f) *confirmed test* dilakukan dengan memindahkan sedikitnya 10 mata ose koloni yang mewakili, pindahkan masing-masing koloni ke dalam tabung BGLB *broth*;
- g) inkubasikan tabung pada 35 °C. Amati setelah 24 - 48 jam terhadap terbentuknya gas; dan
- h) tabung yang menghasilkan gas dianggap sebagai positif organisme *coliform*.

A.10.3.2.5 Perhitungan

$$\text{cfu (koloni/g)} = n \times \frac{a}{b} \times F$$

dengan :

- n adalah jumlah koloni yang tampak;
- a adalah jumlah tabung positif *coliform* (ditunjukkan dengan pembentukan gas di tabung BGLB);
- b adalah jumlah tabung BGLB;
- F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.

A.10.3.2.6 Pernyataan hasil

A.10.3.2.6.1 Cara menghitung

Cara menghitung bakteri *coliform* metode tuang seperti cara menghitung pada angka lempeng total.

A.10.3.2.6.2 Cara menghitung dan membulatkan angka

Cara menghitung dan membulatkan angka bakteri *coliform* metode tuang seperti cara menghitung dan membulatkan angka pada angka lempeng total.

A.10.4 *Salmonella*

A.10.4.1 Prinsip

Contoh yang diuji ditumbuhkan terlebih dahulu pada media pengkayaan dan kemudian ditumbuhkan pada media selektif. Selanjutnya contoh dideteksi dengan menumbuhkannya pada media agar selektif. Koloni-koloni yang diduga *Salmonella* pada media selektif kemudian diisolasi dan dilanjutkan dengan konfirmasi melalui uji biokimia dan uji serologi untuk meyakinkan ada atau tidaknya bakteri *Salmonella*.

A.10.4.2 Peralatan

- a) Neraca terkalibrasi dengan ketelitian 0,1 g;
- b) kertas pH;
- c) pipet 10 ml terkalibrasi;
- d) pipet tetes;
- e) botol pengencer 1 000 ml;
- f) tabung reaksi;
- g) gelas ukur 10 ml dan 100 ml terkalibrasi;
- h) cawan petri 90 mm sampai dengan 100 mm dan 140 mm sampai dengan 150 mm;
- i) gelas sediaan;
- j) inkubator 35 °C terkalibrasi;
- k) oven terkalibrasi;
- l) penangas air;
- m) pengaduk gelas;
- n) sengkeli (ose)/jarum inokulasi;
- o) pensil lilin;
- p) bunsen; dan
- q) otoklaf.

A.10.4.3 Perbenihan dan pereaksi

- a) Media *Rappaport-Vassiliadis* (RV);
- b) *tetrathionate broth* (dengan *iodine* dan *brilliant green*);
- c) *xylose lysine desoxycholate broth* (XLD);
- d) *hektoen enteric agar* (HE);
- e) *bismuth sulfite agar* (BSA);
- f) *triple sugar iron agar* (TSI);
- g) *buffered glucose broth* (MR-VP medium);
- h) *urea agar*;
- i) *brilliant green dye solution* 1 %;
- j) air destilata steril;
- k) pereaksi indol dan pembenihan indol;
- l) *lysine decarboxylation medium* (LDC);
- m) *nutrient agar*;
- n) pereaksi kovacs;
- o) *polyvalent somatic* (O) test;
- p) *polyvalent flagellar* (H) test;
- q) 1 N HCl;
- r) 1 N NaOH;
- s) larutan *physiological saline* 0,85 %;
- t) larutan *potassium hydroxide* 40 %;
- u) larutan *formalized physiological saline*;
- v) *rapid urea broth*;
- w) *mac conkey agar*;

- x) *simmon citrate agar*;
- y) *triptone broth*;
- z) *lactose broth*;
- aa) *trypticase (tryptic) soy broth*;
- bb) *trypticase soy-trytose broth*;
- cc) *malonate broth*;
- dd) *lysin iron agar*;
- ee) *potassium cyanide (KCN) broth*;
- ff) *phenol red carbohydrate broth*;
- gg) *purple carbohydrate broth*;
- hh) *brain heart infussion (BHI) broth*;
- ii) *tryptose blood agar base*; dan
- jj) *bromcresol purple dye solution, 0,2 %*;

A.10.4.4 Cara kerja

A.10.4.4.1 Homogenisasi contoh dan pra-pengkayaan

- a) Timbang 25 g contoh ke dalam botol pengencer 500 ml dan tambahkan 225 ml *Lactose broth* steril, kocok merata sampai tidak ada gumpalan;
- b) biarkan pada suhu ruang selama (60 ± 5) menit dengan wadah tertutup. Kocok perlahan dan atur pH sampai $(6,8 \pm 0,2)$ dengan menambahkan 1 N NaOH atau 1 N HCl steril ;
- c) tambahkan 0,45 ml larutan *Briliant green dye* 1 %, kocok hingga tercampur merata; dan
- d) kendurkan tutup wadah secukupnya $1/4$ putaran, inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C .

A.10.4.4.2 Pengkayaan (*enrichment*)

- a) Kencangkan tutup wadah dan kocok secara perlahan contoh yang telah selesai diinkubasi;
- b) pipet 0,1 ml biakan pra-pengkayaan kedalam 10 ml media RV dan pipet 1 ml biakan pra-pengkayaan kedalam 10 ml *tetrathionate broth*; dan
- c) inkubasikan media RV pada suhu $(42 \pm 0,2)^\circ\text{C}$ selama (24 ± 2) jam dan TT *broth* pada $(35 \pm 2,0)^\circ\text{C}$ selama (24 ± 2) jam dalam penangas air bersirkulasi.

A.10.4.4.3 Penanaman pada pembenihan pilihan/selektif

- a. Kocok contoh yang telah diinkubasi dan dengan menggunakan jarum ose, goreskan sepanjang 3 mm biakan pengkayaan TTB ke dalam cawan petri yang berisi media XLD, HE, dan BS agar. Siapkan BS agar satu hari sebelum digunakan dan simpan ditempat gelap pada suhu ruang sampai siap digores;
- b. ulangi cara di atas dari media pengkayaan RV;
- c. inkubasikan cawan-cawan BSA, HE dan XLD selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C ;
- d. amati kemungkinan adanya koloni *Salmonella*;
Morfologi koloni mempunyai ciri-ciri sebagai berikut :
Ambil 2 atau lebih koloni *Salmonella* dari masing-masing media agar selektif setelah (24 ± 2) jam inkubasi. Koloni-koloni *Salmonella* adalah sebagai berikut :
XLD : koloni berwarna merah muda (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam. Beberapa kultur *Salmonella* memproduksi koloni kuning dengan atau tanpa inti hitam pada media XLD dan HE.
HE : koloni berwarna hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Kebanyakan *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilat atau mungkin nampak hampir semuanya berwarna hitam.

- BS : koloni berwarna coklat, abu-abu sampai hitam dan kadang-kadang kilap logam. Jika masa inkubasi bertambah maka warna media sekitar koloni mula-mula coklat kemudian menjadi hitam. Pada beberapa strain koloni berwarna hijau dengan atau tanpa warna gelap disekitar media.
- jika tidak ada koloni yang khas atau koloni yang diduga pada media BSA setelah inkubasi (24 ± 2) jam, jangan mengambil koloni tapi inkubasi kembali media selama (24 ± 2) jam. Jika tidak ada koloni yang khas atau koloni yang diduga pada media BSA selama inkubasi (48 ± 2) jam, ambil 2 atau lebih koloni yang tidak khas;
 - dengan menggunakan jarum inokulasi steril, ambil secara hati-hati bagian tengah koloni dan inokulasikan ke dalam media TSI agar miring dengan cara menggores agar miring menusuk agar tegak. Tanpa mengambil koloni baru, gunakan jarum yang sama untuk menginokulasikan media LIA dengan cara menusuk agar tegak lebih dahulu, setelah itu goreskan pada agar miring. Karena reaksi *Lysine decarboxilase* sangat anaerobik, LIA miring harus mempunyai tusukan yang dalam (4 cm). Simpan media agar selektif yang telah diambil koloni pada suhu $5^{\circ}\text{C} - 8^{\circ}\text{C}$;
 - inkubasi TSI dan LIA pada suhu 35°C selama (24 ± 2) jam dengan membiarkan tutup sedikit kendur untuk mencegah terbentuknya H_2S yang berlebihan. Pada TSI, kultur *Salmonella* yang khas memberikan reaksi alkalin (merah) pada goresan dan asam (kuning) pada tusukan dengan atau tanpa H_2S (warna kehitaman agar). Pada LIA kultur *Salmonella* yang khas memberikan reaksi alkalin (ungu) pada keseluruhan tabung. Reaksi yang benar-benar kuning pada tusukan dinyatakan sebagai kultur negatif. Jangan hanya melihat perubahan warna pada tusukan untuk menyatakan kultur negatif. Umumnya kultur *Salmonella* membentuk H_2S pada agar miring LIA. Beberapa kultur non *Salmonella* membentuk reaksi merah bata pada agar miring LIA;
 - semua biakan yang memberikan reaksi alkalin pada bagian tusukan di dalam media LIA tanpa memperhatikan reaksi TSI akan potensial sebagai *Salmonella* dan dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukan pada media LIA dan alkalin pada goresannya dan reaksi asam pada tusukan di TSI harus dipertimbangkan juga sebagai potensial *Salmonella* dan harus dilakukan uji biokimia dan serologi. Kultur yang memberikan reaksi asam pada tusukannya di media TSI dapat dinyatakan sebagai bukan *Salmonella*. Bila kultur TSI tidak menunjukkan reaksi khas *Salmonella* (alkalin pada goresan dan asam pada tusukan), ulangi lagi pengujian dengan mengambil koloni yang mencurigakan dari medium selektif yang tidak memberikan kultur duga positif dan inokulasi dengan menggores media TSI dan LIA seperti cara mulai no. f) di atas; dan
 - lakukan uji identifikasi biokimia dan serologi terhadap:
 - tiga kultur presumtif TSI dari 1 set media selektif (HE, XLD dan BSA) yang diinokulasi dari TTB, RV ; dan
 - jika tiga kultur presumtif positif TSI tidak terisolasi dari 1 set media selektif, uji presumtif positif TSI dari media agar yang lain. Uji sedikitnya 6 kultur TSI untuk setiap 25 g contoh makanan.

A. 10.4.5 Identifikasi *Salmonella*

A.10.4.5.1 Kultur campuran

Apabila kultur TSI agar terlihat tercampur, maka goreskan kembali ke dalam media *Mac Conkey agar*, HE atau XLD. Inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C . Amati koloni yang diduga *Salmonella* :

- Mac Conkey agar*;
Koloni yang khas tampak transparan dan tidak berwarna, kadang-kadang dengan inti hitam. Koloni-koloni *Salmonella* akan membentuk area yang terang akibat pengendapan bakteri lain yang kadang-kadang tumbuh;
- Hektoen Enteric* (HE); dan

Koloni-koloni hijau kebiruan sampai biru dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.

c) *Xylose Lysine Desoxycholate* (XLD) agar.

Koloni merah muda (pink) dengan atau tanpa inti hitam. Pada umumnya kultur *Salmonella* membentuk koloni besar, inti hitam mengkilap atau hampir seluruh koloni terlihat berwarna hitam.

Pindahkan sedikitnya 2 koloni terduga *Salmonella* pada media TSI dan LIA seperti butir A.10.4.4.3.f dan lanjutkan seperti pada butir A.10.4.4.3.g.

A.10.4.5.2 Kultur murni

a) Uji urease konvensional; dan

Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* dengan jarum inokulasi ke dalam *urea agar*. Inkubasikan selama (24 ± 2) jam pada suhu 35°C .

b) Uji urease cepat;

Inokulasikan dari TSI yang diduga *Salmonella* dengan jarum inokulasi ke dalam *rapid urea broth*. Inkubasikan 2 jam dalam penangas air pada suhu $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Reaksi *Salmonella* yang khas untuk uji urease memberikan hasil negatif (tidak terjadi perubahan warna)

A.10.4.5.3 Pengujian kultur urease negatif

a) *Lysine Decarboxylase Broth* (LDB);

Uji ini dilakukan hanya jika reaksi LIA meragukan. Ambil 1 ose dari TSI dan inokulasikan ke dalam media LDB. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. *Salmonella* memberikan reaksi alkalin ditandai dengan warna ungu pada seluruh media. Warna negatif ditunjukkan dengan warna kuning pada seluruh media. Jika hasil reaksi tidak menunjukkan warna kuning atau ungu tambahkan beberapa tetes 0,2 % *bromocresol purple dye* dan amati perubahan warnanya;

b) *Phenol red dulcitol* atau *purple broth base* dengan 0,5 % *dulcitol*; dan

Inokulasi media *dulcitol broth* dari biakan TSI. Kendurkan tutupnya dan inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. Pada umumnya *Salmonella* memberikan hasil positif, ditandai dengan pembentukan gas dalam tabung durham dan pH asam (kuning) pada media. Reaksi negatif ditandai dengan tidak terbentuknya gas pada tabung durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.

c) *Tryptone (tryptophane) broth* (TB);

Inokulasi media *tryptone broth* dari biakan TSI. Inkubasikan selama 24 jam pada suhu 35°C dan selanjutnya ikuti prosedur di bawah ini :

- *Potassium Cyanide* (KCN) broth;

Pindahkan 1 sengkelit biakan dari TB 24 jam ke dalam media KCN broth. Tutup tabung rapat-rapat dan lapiasi dengan kertas parafilm. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C tetapi amati setelah 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya pertumbuhan ditandai dengan adanya kekeruhan. Umumnya *Salmonella* tidak tumbuh pada media ini dengan ditandai terjadinya kekeruhan.

- *Malonate broth*; dan

Pindahkan 1 sengkelit dari biakan TB ke dalam media *Malonate broth*. Inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam. Kadang-kadang *Malonate broth* tidak diinokulasi berubah menjadi biru. Oleh karena itu gunakan *Malonate broth* sebagai kontrol. Reaksi positif ditandai dengan perubahan warna menjadi biru. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi negatif (hijau atau tidak ada perubahan warna) pada *broth* ini.

- Uji indol.

Dari media TB yang tersisa, tambahkan 0,2 ml sampai dengan 0,3 ml pereaksi *Kovacs*. Amati segera setelah penambahan pereaksi. Reaksi positif ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan media. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi negatif (tidak terbentuk cincin merah pada permukaan media). Reaksi yang warnanya berada antara jingga dan merah muda dinyatakan sebagai positif.

Nyatakan kultur sebagai bukan *Salmonella* bila reaksi indol positif dan flagellar (H) negatif atau KCN positif dan LDB negatif;

A.10.4.5.4 Uji serologi polyvalent flagellar (H)

- Inokulasi dari masing-masing TSI agar yang memberikan reaksi urease negatif ke dalam:
 - BHI broth, dan inkubasi selama 4 jam sampai dengan 6 jam pada suhu 35 °C sampai terlihat pertumbuhan (untuk diuji pada hari yang sama) atau
 - Trypticase Soy Trypticase broth* (TSTB) dan inkubasi selama (24 ± 2) jam pada suhu 35 °C (untuk uji hari berikutnya). Tambahkan 2,5 ml larutan *formalinized physiological saline* ke dalam 5 ml kultur di atas;
- siapkan 2 kultur dari TSI (contoh dan kontrol) yang telah diberi *formalinized physiological saline* dan uji dengan *Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera. Masukkan (±0,5) ml larutan *saline Salmonella polyvalent flagellar* (H) antisera dalam tabung serologi 10 mm x 75 mm atau 13 mm x 100 mm. Tambahkan 0,5 *formalinized physiological saline* dengan 0,5 ml *formalinized antigen*. Inkubasikan campuran tersebut dalam penangas air pada suhu 48 °C - 50 °C. Amati setiap interval waktu 15 menit dan amati hasilnya dalam 1 jam.
 - positif apabila terjadi penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol; dan
 - negatif apabila tidak ada penggumpalan dalam uji campuran dan tidak ada penggumpalan dalam kontrol

A.10.4.5.5 Uji serologi dengan polyvalent somatic (O)

- Dengan menggunakan pensil lilin. Buat garis persegi panjang berukuran 1 cm x 2 cm di atas kaca atau cawan petri plastik berukuran 15 mm x 100 mm atau kaca gelas sediaan;
- emulsikan biakan dari TSI miring umur 24 jam - 48 jam dengan 2 ml 0,85% saline menggunakan ose (dapat juga menggunakan biakan dari *Tryptose Blood agar base* tanpa darah);
- tambahkan 1 tetes suspensi biakan di atas masing-masing bagian empat persegi panjang yang telah diberi tanda dengan pensil lilin;
- tambahkan 1 tetes larutan saline pada bagian pertama dan tambahkan 1 tetes *polyvalent somatic* (O) anti serum kedalam bagian yang lain;
- campurkan atau homogenkan bagian atas menggunakan ose yang bersih dan steril selama 1 menit; dan
- klasifikasi uji *polyvalent somatic* (O) menunjukkan hasil sebagai berikut:
 - positif: terjadi penggumpalan di dalam pencampuran/homogenisasi tes, pada kontrol saline tidak terjadi penggumpalan;
 - negatif: tidak terjadi penggumpalan di dalam pencampuran/homogenisasi tes, pada kontrol saline tidak terjadi penggumpalan; dan
 - tidak spesifik: terjadi penggumpalan di dalam pencampuran/homogenisasi tes, pada kontrol saline.

A.10.4.5.6 Uji biokimia tambahan

Nyatakan sebagai *Salmonella*, kultur yang memberikan reaksi yang khas seperti pada Tabel A.3 butir 1 sampai dengan 11. Jika 1 kultur TSI dari setiap 25 g contoh menunjukkan *Salmonella*, uji biokimia tambahan tidak diperlukan. Kultur yang memberikan reaksi positif

pada uji serologi Flagellar (H) tapi tidak menunjukkan karakteristik *Salmonella* pada uji biokimia, harus dimurnikan seperti pada A.10.4.5.1 di atas dan uji kembali pada A.10.4.5.2.

Lakukan uji tambahan berikut ini terhadap kultur yang tidak memberikan reaksi yang khas seperti Tabel A.3:

- a) *Phenol red lactose atau purple lactose broth*;
 Inokulasi *broth* ini dengan kultur TSI agar miring yang telah diinkubasi selama 24 jam sampai dengan 48 jam. Inkubasi selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C , tetapi amati setelah 24 jam.
 Positif, apabila terjadi pembentukan asam (kuning) dan gas pada tabung durham. Apabila hanya terjadi pembentukan asam, maka dapat dinyatakan positif. Umumnya *Salmonella* memberikan hasil negatif, ditunjukkan dengan tidak terbentuknya gas pada tabung durham dan warna merah (*phenol red* sebagai indikator) atau ungu (*bromocresol purple* sebagai indikator) pada seluruh media.
 Jika kultur memberikan reaksi *lactose* positif, dinyatakan sebagai bukan *Salmonella*, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi alkalin pada LIA atau reaksi positif pada *malonate broth*.;
- b) *Phenol red sucrose atau purple sucrose broth*;
 Ikuti prosedur seperti pada A.10.4.5.6.a nyatakan sebagai bukan *Salmonella* pada kultur yang memberikan reaksi *lactose* positif, kecuali kultur yang memberikan reaksi asam pada agar miring TSI dan reaksi positif (alkalin) pada LIA.
- c) *Methyl Red - Voges Proskauer (MR-VP)*; dan
 Inokulasi medium dengan sedikit biakan TSI agar miring dan inkubasikan selama (48 ± 2) jam pada suhu 35°C .
 Lakukan uji *Voges-Proskauer (MR-VP)* pada suhu ruang sebagai berikut :
 Pindahkan 1 ml MR-VP *broth* yang telah diinkubasi selama 48 jam ke dalam tabung reaksi steril dan inkubasikan kembali MR-VP *broth* selama 48 jam pada suhu 35°C . Tambahkan 0,6 ml alpha naftol dan aduk. Tambahkan 0,2 ml larutan KOH 40 % dan aduk kembali. Untuk mempercepat reaksi tambahkan sedikit kristal kreatin dan amati hasilnya setelah 4 jam. Perubahan warna menjadi merah bata sampai merah delima pada media menunjukkan reaksi positif. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi VP negatif.
Uji merah metil (MR)
 Tambahkan 5 tetes indikator merah metil ke dalam media MR-VP yang telah diinkubasi selama 96 jam. Amati hasilnya dengan segera. Umumnya *Salmonella* memberikan reaksi positif, ditandai dengan terjadinya difusi warna merah pada media. Terjadinya warna kuning menunjukkan reaksi negatif;
 Nyatakan sebagai bukan *Salmonella* kultur yang memberikan reaksi KCN dan VP positif serta MR negatif.
- d) *Simmons citrate agar*;
 Inokulasi medium dengan menggunakan jarum yang mengandung biakan dari TSI agar miring, dengan cara menggores agar miring dan menusuk agar tegak. Inkubasikan selama (96 ± 2) jam pada suhu 35°C .
 - positif, apabila terjadi pertumbuhan yang biasanya diikuti dengan perubahan warna dan hijau menjadi biru. Umumnya *Salmonella* memberikan hasil sitrat positif; dan
 - negatif, apabila tidak ada atau sedikit sekali pertumbuhan dan tidak terjadi perubahan warna.

A.10.4.5.7 Pernyataan hasil

Laporkan sebagai *Salmonella* kultur-kultur yang mempunyai reaksi seperti pada tabel A.3. Laporkan sebagai bukan *Salmonella* kultur-kultur yang memberikan reaksi seperti pada tabel A.4. Bila tidak ada 1 kultur TSI yang menunjukkan reaksi *Salmonella* pada uji biokimia,

lakukan uji biokimia mulai dari A.10.4.5.3 terhadap kultur yang memberikan reaksi urease negatif dari contoh yang sama.

Tabel A.3 - Reaksi biokimia dan serologi *Salmonella*

No.	Uji substrat	Hasil Reaksi Positif	Hasil Reaksi Negatif	<i>Salmonella</i> Reaksi Species ^a
1	<i>Glucose</i>	Tusukan kuning	Tusukan merah	+
2	<i>Lysine decarboxylase (LIA)</i>	Tusukan ungu	Tusukan kuning	+
3	<i>H₂S (TSI dan LIA)</i>	Hitam	Tidak hitam	+
4	<i>Urease</i>	Warna ungu sampai merah	Tidak ada perubahan warna	-
5	<i>Lysine decarboxy Broth</i>	Warna ungu	Warna kuning	+
6	<i>Phenol red dulcitol broth</i>	Warna kuning dengan gas	Tanpa/tidak berbentuk gas, tidak berubah warna	+ ^b
7	<i>KCN broth</i>	Pertumbuhan	Tidak ada pertumbuhan	-
8	<i>Malonate broth</i>	Warna biru	Tidak berubah warna	- ^c
9.	<i>Indol test</i>	Permukaan warna merah	Permukaan warna kuning	-
10.	<i>Polyvalent flagellar test</i>	Aglutinasi	Aglutinasi	+
11.	<i>Polyvalent somatic test</i>	Aglutinasi	Aglutinasi	+
12.	<i>Phenol red lactose broth</i>	Warna kuning dengan/tanpa gas	Tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	- ^c
13	<i>Phenol red sucrose broth</i>	Warna kuning dengan/tanpa gas	Tidak berbentuk gas dan tidak berubah warna	-
14.	<i>Voges-prokquer test</i>	Ungu sampai merah	Tidak berubah warna	-
15.	<i>Methyl red test</i>	Merah menyebar	Kuning menyebar	+
16.	<i>Simmons Citrate</i>	Pertumbuhan, warna biru	Tidak ada pertumbuhan dan perubahan	V

Keterangan :

+^a adalah 90% atau lebih positif dalam satu atau dua hari

- adalah 90% atau lebih positif dalam satu atau dua hari

V adalah variabel

^b adalah mayoritas dari kultur *arizonate* : negatif

^c adalah mayoritas dari kultur *arizonate* : positif

Tabel A.4 - Reaksi biokimia dan serologi untuk non *Salmonella*

No.	Test Substrat	Hasil
1.	<i>Urease</i>	Positif (warna ungu merah)
2.	<i>Test indol dan test polivalen flagellar (H)</i>	Negatif (tidak ada penggumpalan)
3.	<i>Lysine decarboxylase dan KCN broth</i>	Negatif (ada pertumbuhan) Positif (warna kuning)
4.	<i>Phenol red lactose broth</i>	Positif (warna kuning ada/tidak ada gas) ^a ^b
5.	<i>Phenol red sucrose broth</i>	Positif (warna kuning ada/tidak ada gas) ^b
6.	<i>Voges-Proskauer test methyl red test</i>	Positif (warna pink sampai merah) Negatif (warna kuning menyebar)
Keterangan : ^a <i>Test malonate broth</i> positif lebih lanjut untuk mengamati jika biakan tersebut <i>Salmonella arizonae</i> ^b Jangan dibuang biakan positif jika biakan LIA menunjukkan reaksi bercirikan <i>Salmonella</i> uji lebih lanjut untuk mengamati apakah spesies tersebut <i>Salmonella</i>		

A.10.5 *Staphylococcus aureus* (metode plate count)

A.10.5.1 Prinsip

Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada pembenihan khusus setelah diinkubasi pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai dengan 48 jam dan dilanjutkan dengan uji koagulase

A.10.5.2 Peralatan

- Spreader* steril dari gelas;
- botol pengencer 500 ml;
- tabung reaksi;
- gelas ukur 1 ml dan 10 ml terkalibrasi;
- cawan petri;
- gelas sediaan;
- inkubator 35 °C terkalibrasi;
- oven terkalibrasi;
- pipet ukur terkalibrasi; dan
- jarum ose/inokulasi

A.10.5.3 Perbenihan dan pereaksi

- Baird-parker* agar;
- brain heart infusion broth* (BHIB); dan
- plasma kelinci.

A.10.5.4 Cara kerja

- Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh seperti pada A.10.1;
- pipet masing-masing 0,3 ml; 0,3 ml; 0,4 ml larutan contoh dari setiap seri pengenceran ke dalam masing-masing ke 3 cawan petri yang berisi media BPA;
- sebar contoh secara merata dengan menggunakan *spreader* steril. Tahan cawan dalam posisi tegak lurus sampai contoh terserap oleh medium (± 10 menit). Jika contoh

tidak terserap oleh medium, tempatkan cawan petri pada posisi tegak lurus di dalam inkubator selama 1 jam sebelum cawan petri di balik;

- d) inkubasikan pada suhu 35 °C selama 45 jam sampai dengan 48 jam; dan
- e) pilih cawan petri yang mengandung 20 koloni sampai dengan 200 koloni dan hitung yang diduga koloni *Staphylococcus aureus* yaitu koloni berwarna abu-abu sampai hitam mengkilat dengan lingkaran cerah disekelilingnya dan seringkali lingkaran jernih, koloni mempunyai getah kental ketika disentuh dengan jarum ose.

A.10.5.5 Uji koagulase

- a) Pindahkan koloni yang diduga ke dalam tabung berisi 0,2 ml sampai dengan 0,3 ml *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB);
- b) inkubasikan pada suhu 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam;
- c) tambahkan koagulasi plasma kelinci sebanyak 0,5 ml ke dalam kultur BHIB dan campur;
- d) inkubasikan campuran plasma kelinci dengan biakan BHIB pada 35 °C selama 18 jam sampai dengan 24 jam dan memeriksanya, setelah 6 jam akan terbentuk penggumpalan. Hanya bentuk yang kokoh dan sempurna serta dapat bertahan di dalam wadahnya ketika tabung dibalikkan disebut sebagai positif *Staphylococcus aureus*;
- e) amati ada tidaknya koagulasi. Bila tidak terjadi koagulasi lanjutkan inkubasi pada suhu kamar selama 24 jam, dan amati kembali ada tidaknya koagulasi;
- f) ratakan koloni dari ketiga cawan petri yang diwakili oleh koloni-koloni yang memberikan reaksi penggumpalan dan dikalikan dengan faktor pengencerannya; dan
- g) hitung jumlah *Staphylococcus aureus* dalam 1 g atau 1 ml contoh.

A.10.5.6 Perhitungan

Angka *Staphylococcus aureus* (koloni/g) = $n \times F$

dengan:

n adalah jumlah koloni, (koloni/g);

F adalah faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai

A.10.6 Kapang / khamir

A.10.6.1 Prinsip

Pertumbuhan kapang/ khamir dalam media yang sesuai, setelah diinkubasikan pada suhu $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ selama 5 hari.

A.10.6.2 Peralatan

- a) Cawan petri 15 mm x 100 mm;
- b) pipet ukur 1 ml dan 10 ml terkalibrasi;
- c) penangas air $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$;
- d) inkubator 25 °C terkalibrasi;
- e) alat penghitung koloni;
- f) mikroskop; dan
- g) pH meter.

A.10.6.3 Pembenihan dan pengencer

Pilihan penggunaan media:

- a) Media dengan penambahan larutan antibiotik;
 - dichloran rose bengal chloramphenicol (DRBC) agar;
 - dichloran 18 % glycerol (DG 18) agar;

antibiotik ditambahkan di media kapang/khamir untuk mencegah pertumbuhan bakteri. *Chloramphenicol* adalah salah satu pilihan antibiotik, karena stabil saat diotoklaf. Konsentrasi antibiotik yang diizinkan adalah 100 mg per liter media. Jika tampak pertumbuhan bakteri, siapkan media dengan penambahan 50 mg per liter *chloramphenicol* sebelum otoklaf dan 50 mg per liter *chlortetracycline* steril saat media mulai di kondisikan, tepat sebelum menuang media dalam cawan.

- b) *plate count agar* (PCA);
tambahkan 100 mg *chloramphenicol* per liter jika menggunakan media ini. Media ini tidak cocok jika diduga ada kapang *spreader* (contoh *mucor*, *rhizopus* dll);

- c) *malt agar* (MA);

- d) *malt extract agar* (kapang dan khamir) (MEAYM); dan

- e) *potato dextrose agar* (PDA), tersedia komersial:

<i>infusion from white potatoes</i>	200 g
<i>dextrose</i>	20 g
<i>agar</i>	20 g
air suling	1 000 ml

Larutkan semua bahan di atas. Masukkan dalam labu, sterilkan pada 121 °C selama 15 menit. Sebelum dipergunakan dinginkan sampai 50 °C dan pH diatur 3,5 dengan asam tartrat 10 % steril. Penurunan pH dapat diganti dengan penambahan 4 ml antibiotik (1g/100ml). Campurkan, kemudian tuangkan ke dalam cawan petri.

A.10.6.4 Cara kerja

- a) Lakukan persiapan dan homogenisasi contoh sesuai A.10.1;
b) terdapat dua metode persiapan media dalam cawan, yaitu :
- metode menyebar pada cawan (untuk pilihan media DRBC dan DG 18):
pipet 0,1 ml masing-masing pengenceran secara aseptik ke dalam media padat dan sebarkan merata dengan menggunakan batang gelas.
- metode menuang pada cawan (untuk pilihan media DG 18):
pipet 1,0 ml masing-masing pengenceran ke dalam cawan petri 15 mm x 100 mm dan sesegera mungkin tuangkan 20 ml sampai dengan 25 ml media. Campurkan dengan menggoyang cawan secara perlahan searah jarum jam, kemudian berlawanan arah jarum jam dalam jangka 1 menit sampai dengan 2 menit.
c) biarkan hingga campuran dalam cawan petri membeku;
d) pipet masing-masing 1 ml dari tingkat pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-2} ke dalam cawan petri steril secara duplo;
e) masukkan semua cawan petri dengan posisi tidak terbalik ke dalam inkubator dan inkubasi pada ruang gelap bersuhu 25 °C selama 5 hari;
f) hitung koloni kapang/khamir (perhitungan dapat dilakukan mulai hari ke tiga sampai hari ke lima). Jika setelah 5 hari tidak ada yang tumbuh, tambahkan waktu inkubasi selama 48 jam; dan
g) nyatakan hasil perhitungan sebagai jumlah kapang/khamir per gram contoh.

A.10.6.5 Pernyataan hasil

A.10.6.5.1 Cara menghitung

Cara menghitung kapang/khamir seperti cara menghitung pada angka lempeng total.

A.10.6.5.2 Cara menghitung dan membulatkan angka

Cara menghitung dan membulatkan angka kapang/khamir seperti cara menghitung dan membulatkan angka pada angka lempeng total.

Bibliografi

- SNI 7387: 2009, Batas cemaran logam berat dalam pangan.
- SNI 7388: 2009, Batas maksimum cemaran mikroba dalam pangan.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. Official Methods of Analysis of the AOAC International. 18th ed. Chapter 9.1.01. Method 986.15, Arsenic, Cadmium, Lead, Selenium, and Zinc in Human and Pet Foods, Multielement Method.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. Official Methods of Analysis of the AOAC International. 18th ed. Chapter 9.1.09. Method 999.11, Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in Foods.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. Official Methods of Analysis of the AOAC International. 18th ed. Chapter 9.2.22. Method 971.21, Mercury in Food.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. Official Methods of Analysis of the AOAC International. 18th ed. Chapter 9.2.35. Method 985.16, Tin in Canned Foods.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. Official Methods of Analysis of the AOAC International. 18th ed. Chapter 17.2.01. Method 966.23, Microbiological Methods.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. Official Methods of Analysis of the AOAC International. 18th ed. Chapter 33.1.01. Method 968.12, Sampling of Dairy Products.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. Official Methods of Analysis of the AOAC International. 18th ed. Chapter 33.2.11. Method 991.20, Nitrogen (Total) in Milk.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. Official Methods of Analysis of the AOAC International. 18th ed. Chapter 33.2.26. Method 989.05, Fat in Milk.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. Official Methods of Analysis of the AOAC International. 18th ed. Chapter 33.2.43. Method 990.19, Solid (total) in Milk.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. Official Methods of Analysis of the AOAC International. 18th ed. Chapter 33.2.44. Method 990.20, Solid (total) in Milk.
- Codex Alimentarius Commission. 1999. Standard for Sweetened Condensed Milks. Codex Stan 282-1971, Rev. 1999, Amend. 2010.
- Egan, H., R.S. Kirk and R. Sawyer. 1981. Pearson's Chemical Analysis of Foods, 8th ed. Chapter 6. Sugars and Preserves. Longman Scientific Publishers, London..
- Egan, H., R.S. Kirk and R. Sawyer. 1981. Pearson's Chemical Analysis of Foods, 8th ed. Chapter 14. Dairy Foods. Longman Scientific Publishers, London.
- Food and Drug Administration. 2003. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 1. Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate.
- Food and Drug Administration. 2001. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 3. *Aerobic Plate Count*.
- Food and Drug Administration. 2002. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 4. *Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria*.
- Food and Drug Administration. 2006. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 5. *Salmonella*.
- Food and Drug Administration. 2001. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 12. *Staphylococcus aureus*.

Food and Drug Administration. 2001. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 18. *Mold, Yeast and Mycotoxin*.









BADAN STANDARDISASI NASIONAL - BSN
Gedung Manggala Wanabakti Blok IV Lt. 3,4,7,10
Jl. Jend. Gatot Subroto, Senayan Jakarta 10270
Telp: 021- 574 7043; Faks: 021- 5747045; e-mail : bsn@bsn.go.id